



Università degli Studi di Pisa

Facoltà di Farmacia
Corso di Specializzazione in Biochimica Clinica

Tesi di specializzazione

**Progetto: allestimento di un Laboratorio di Microbiologia
nella Provincia angolana di Huambo**

Direttore della Scuola di Specializzazione in Biochimica Clinica
Ch.mo Prof. Antonio Lucacchini

Candidato
Dott. Constantino Salomão

Relatore
Prof. Mario Campa

Sommario

Il candidato proviene dall'Angola e, in particolare, dalla Provincia di Huambo. Tale Provincia ha una estensione di circa 35.000 Km² e una popolazione di circa 2 milioni e mezzo di abitanti. Nella città di Huambo (capoluogo di Provincia) sono presenti alcune strutture sanitarie ma, in tutta la Provincia, non esiste alcun Laboratorio di Microbiologia.

La necessità di un servizio di questo tipo risulta ben chiara dai dati esposti nella tesi; il presente lavoro di tesi è scaturito dalle osservazioni del candidato e dall'intento di acquisire le competenze che gli permettano di allestire e dirigere un laboratorio di analisi microbiologiche, una volta ritornato nel suo paese. Tale Laboratorio di Microbiologia potrebbe colmare alcune lacune diagnostiche presenti a Huambo, tenendo conto della situazione logistica ed economica della Provincia.

In questa ottica, durante il tirocinio svolto per la stesura di questa tesi si è cercato di focalizzare l'attenzione sulle tecniche di base, in modo da fornire risposte semplici, rapide, e il più possibile a basso costo, ai quesiti diagnostici più frequenti nella situazione sanitaria locale.

In un secondo periodo, tale laboratorio potrebbe diventare anche un luogo di tirocinio per la formazione dei tecnici di laboratorio angolani nel campo della microbiologia.

La tesi è suddivisa in cinque capitoli:

Nel primo capitolo vengono trattati in modo generale: i dati demografici dell'Angola, il profilo sanitario e i dati epidemiologici.

Il secondo capitolo è dedicato ad alcune nozioni fondamentali riguardanti il laboratorio clinico, dai sistemi chiusi a quelli aperti, l'organizzazione e definizione di modelli dinamici di lavoro, utilizzo dello spazio, le liste di lavoro giornaliero, la valutazione del carico di lavoro, l'organizzazione di un programma di sicurezza in un laboratorio clinico.

Nel terzo capitolo, sono descritte le tecniche più importanti che stanno alla base degli esami batteriologici e parassitologici.

Nel quarto capitolo vengono riportati i risultati degli esami batteriologici e parassitologici svolti nel periodo da dicembre 2010 a luglio 2011 all'U.O di Microbiologia Universitaria del Presidio Ospedaliero di Cisanello.

Nell'ultimo capitolo vengono tratte le conclusioni.

RINGRAZIAMENTI

In primo luogo, ringrazio Suor Manuela che mi ha dato la possibilità di studiare, l'Associazione Amici di Valeria che ha sostenuto tutti i miei studi universitari e di specializzazione con buona volontà, integrando con la borsa di studio del DSU (Diritto allo Studio Universitario) conservata con tanto impegno personale per 10 anni. L'associazione non mi ha fatto mancare niente durante tutto questo tempo e ne sono molto grato. In modo particolare, ringrazio Don Angelo Falchi, il presidente dell'associazione e la segretaria, Monica Salcioli con suo marito, Rossano Salcioli, per l'accoglienza e l'appoggio prestato anche nei momenti più difficili della mia vita; sono stato molto bene con loro. Ringrazio il laboratorio di U.O di Microbiologia di Cisanello, dove ho svolto la mia tesi, per la pazienza ed impegno che hanno dedicato per la stesura della mia tesi: il Prof. Mario Campa, la Dott.ssa Simona Barnini e la Dott.ssa Barbara Castagna. Ringrazio i miei genitori, Jacinto Somaykwenje e Juliana Ngeve, la mia moglie Rosária Nalima Kanjolomba Salomão ed i miei figli Jacinto Somayakwenje Salomão, Juliana Ngeve Salomão e Adelino Tchikulundunda Somayakwenje Salomão per il coraggio e tutto quanto hanno saputo darmi lungo tutto questo tempo; ringrazio tutta la mia famiglia, in modo particolare le mie sorelle, mio cognato Benedito Tchikoka, la mia cugina Cândida, mio fratello Benedito Kayombe e tutti i miei nipoti. Ringrazio anche il mio caro amico José Katito con cui sono venuto in Italia, è tramite lui che ho conosciuto Suor Manuela e lo ringrazio anche e per le nuove esperienze di vita condivise insieme, durante tutto questo tempo. Ringrazio Emilio Bracco e la sua famiglia, che in maniera generosa e gentile ci ha ospitato per i primi tre mesi del nostro arrivo. Ringrazio tutti i miei professori della Facoltà di Farmacia e della Scuola di Specializzazione in Biochimica Clinica, in modo particolare la prof.ssa Irene Giorgi, per essere stata accanto a me durante tutto il tempo della mia formazione. Infine ringrazio tutti i miei colleghi della Scuola di Specializzazione, che sono stati tutti bravi e mi ricorderò sempre di loro.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Irmã Manuela quem me deu a possibilidade de estudar, a Associação Amigos de Váleria “Associazione Amici di Valeria” que sustentou os meus estudos universitários e de especialização com uma boa vontade, integrando com a bolsa de estudo do DSU (Direito ao Estudo Universitário) conservada com muito empenho pessoal por 10 anos. A associação nunca me fez faltar algo e estou muito satisfeito por isso. Em modo particular, agradeço o Dom Angelo Falchi, o presidente da associação e a secretária Monica Salcioli con o seu marido Rossano Salcioli, pelo acolhimento e apoio prestado mesmo nos momentos mais difíceis da mia vida; vivi muito bem com eles. Agradeço o laboratório U.O de Microbiologia de Cisanello onde desenvolvi a minha tese, pela paciência e empenho que dedicaram para a minha tese: Prof. Mario Campa, Dr.^a Simona Barnini e a Dr.^a Barbara Castagna. Agradeço os meus pais, Jacinto Somayakwenje e Juliana Ngeve, a minha esposa Rosária Nalima Kanjolomba Salomão, os meus filhos Juliana Ngeve Salomão, Jacinto Somayakwenje Salomão e Adelino Tchikulundunda Somayakwenje Salomão pela coragem e tutto aquilo que souberam dar-me ao longo de todos estes anos; agradeço a minha família, em modo particular as minhas irmãs, o meu cunhado Benedito Tchikoka, o meu irmão Benedito Kayombe, a prima Cândida e todos os meus sobrinhos. Agradeço o meu querido amigo José Katito com quem viemos juntos, a minha vinda deveu-se a ele, foi através dele que conheci a irmã Manuela, e pelas novas experiências de vida compartilhadas juntamente ao longo de todos estes anos. Agradeço o Emilio Bracco juntamente com a sua famiglia, que em maneira muito generosa e gentil hospedaram-nos durante os primeiros três meses da nossa chegada. Agradeço todos os meus professores da Faculdade da Fármacia e da Escóla de Especialização em Bioquímica Clínica, em modo particular a professora Irene Giorgi pelo acompanhamento prestado durante toda a minha a formação. Por fim agradeço todos os meus colegas da Escola de Especialização, comportaram-se todos bem.

ONDAKA YOLUPADU

Tchatete, ndipadula Mantele Manuela wanyha epodondolo lyokuntange-la kulo ko Italia, Ohongelo ya Kamba va Valeria “Associazione Amici di Valeria” ina yangwatisako kelilongiso lyange lonjongole ywa, ndango ku-ti ndakwata hale ekwatiso lyelilongiso yo DSU etchi tchisoka ekwi kali-ma omo lyekolelo, lyepandi kwenda ombili ndakwata kokulilongisa. Ndipandula tchitunda Angelo Fachi osongwi yo Ohongele kwenda usonehi watcho Monica Salcioli lulume wahe Rossano Salcioli, ndetchi tchitunda Angelo Falchi eye watusingilisa konjo yaye, vatukwama kwenda vatutata tchiwa anhamo atcho osi twakaladentikulo. Ndipandula olonjali vyange: Jacinto Somayankwenje kwenda Julina Ngeve, ukāyi wange Rosária Na-lima Kanjolomba Salomão, omala vange Juliana Ngeve Salomão, Jacinto Somayakwenje Salomão kwenda Adelino Tchikulundunda Somayakwen-je Salomão omo lyempandi vatela oku nyha osimbu yosi yanhamo ndakala ndeti kulo. Olupandu wange upitilevo kepata lyange lyosi omo lyovina vyosi vandingila, enene vali va mukāi vange vosi, nawa Benedito Tchi-koka, pilima Cândida, umalehe wange Benedito Kayombe kwenda ovi-mumba vyange vyosi. Ndipandula onjo yokutala ovoveyi vyapuka “U.O di Microbiologia di Cisanello” muna ndalingila upange wosi ulo, ekolelo kwenda epandi vakwata otcho upange wange uswisepo: Ulongisi yulume Mario Campa, Ondongolosi yukāyi Simona Barnini kwendavo Ondogolo-si yukāyi Barbara Castagna. Ndipandulavo Emilio Bracco kwenda epata lyahē, mekandu kolosāi vyosi vitatu viatete etchi twapitila twasiñgilile ko-njoyahe, twakala tchiwa lavo. Ndipadula kamba lyange José Katito una tweyilila kumosi, ndetchi okwiya kwange kulo pakisi eye, eye wandikuli-sisa Mantele Manuela, kwenda ekalo lyokalye twatēla okwambatisa kumo-si. Ndipandula alongisi vyange vyosi vyo kosikola yhemba kwenda lava va kwasikola yo kutala ekalo lyetimba, enene vali Ulongisi yukāyi Irene Gior-gi omo eye watela okundikwama tchiwa anhamo osi ndakala ndeti kulo lo kulilongisa. Kokusulako ndipandula vakwetu vosi vana twakalela kumosi kelilongiso lyokupotoloa ekalo lyetimba.

Indice

1	INTRODUZIONE	10
1.1	Demografia dell'Angola	11
1.2	Profilo sanitario	15
1.2.1	Settore pubblico	18
1.2.2	Settore privato	18
1.2.3	Settore della Medicina Tradizionale	18
1.3	Quadro epidemiologico	19
1.3.1	Malaria	20
1.3.2	Tubercolosi polmonare	22
1.3.3	Malattie diarroiche acute	22
1.3.4	HIV	23
1.3.5	Lebbra	23
1.3.6	Tripanosomiasi	24
1.3.7	Schistosomiasi	24
1.3.8	Epidemie	24
1.3.9	Infrastrutture sanitarie	25
1.4	Scopo della tesi: progetto di allestimento di un Laboratorio di Microbiologia nella Provincia di Huambo	30
1.4.1	Situazione sanitaria della Provincia di Huambo	30
1.4.2	<i>Hospital Geral do Huambo</i>	31
1.4.3	<i>Hospital Sanatorio do Huambo</i>	33
1.4.4	Motivazione del progetto	33
2	ORGANIZZAZIONE E SUPERVISIONE DI UN LABORATORIO CLINICO	34
2.1	Dai sistemi chiusi a quelli aperti	35
2.1.1	Il laboratorio clinico come sottosistema	35
2.2	Organizzazione e definizione di modelli dinamici di lavoro	37
2.3	L'utilizzo dello spazio	38
2.3.1	Caratteristiche strutturali del laboratorio	39
2.3.2	Necessità procedurali e strumentali	39

2.3.3	Il fattore umano	40
2.3.4	La tecnica di disposizione spaziale	41
2.4	Le liste di lavoro giornaliero	41
2.5	Valutazione del carico di lavoro	42
2.6	Organizzazione di un programma di sicurezza in un laboratorio clinico	44
2.6.1	Sicurezza biologica	44
2.6.2	Sicurezza chimica	46
2.6.3	Sicurezza anticendi	48
2.6.4	Sicurezza elettrica	52
3	MATERIALI E METODI	53
3.1	Esame batteriologico	54
3.1.1	Raccolta dei campioni	54
3.1.2	Il campione biologico	54
3.1.3	Terreni di coltura	54
3.1.4	Metodi di semina	57
3.1.5	Semina ad isolamento	57
3.1.6	Semina di un tampone	58
3.1.7	Semina a reticolo	58
3.1.8	Semina dei campioni	60
3.1.9	Colorazione di Gram	67
3.1.10	Esame a fresco con blu di metilene	69
3.1.11	Test della catalasi	69
3.1.12	Test della coagulasi	70
3.1.13	Test di solubilità nella bile	74
3.1.14	Test dell'indolo	76
3.1.15	Test della citocromo ossidasi	76
3.1.16	PYR test	77
3.1.17	Test di sensibilità a bacitracina e SXT	78
3.1.18	Test di sensibilità all'optochina	80
3.1.19	Interpretazione delle colture	80
3.1.20	Separazione di morfotipi batterici nelle colture miste	82
3.1.21	Valutazione delle colture mediante colorazione di Gram	82
3.1.22	Procedure rivolte all'identificazione preliminare degli isolati batterici	83
3.1.23	Identificazione di <i>Staphylococcus aureus</i>	84
3.1.24	Identificazione di <i>Streptococcus pyogenes</i>	85
3.1.25	Identificazione di <i>Streptococcus pneumoniae</i>	86
3.1.26	Suscetibilità agli antibiotici	88

3.1.27	Diagnostica microscopica di infezione tubercolare polmonare attiva	92
3.1.28	Terapia anti-tubercolare polmonare	97
3.1.29	Meccanismo d'azione dei farmaci anti-tubercolari di prima linea	99
3.1.30	Sistemi BD BACTEC TM FX (Becton, Dickison and Company) e Bact/ALLERT 3D (bioMérieux) . . .	103
3.1.31	Sistemi API (bioMérieux)	104
3.1.32	Sistema Vitek 2 (bioMérieux)	118
3.2	Esame parassitologico	119
3.2.1	Parassiti intestinali	119
3.2.2	Parassiti ematici	133
4	RISULTATI	146
4.1	Esame batteriologico	147
4.1.1	Lettura delle piastre	147
4.2	Esame parassitologico	154
5	CONCLUSIONI	155
	BIBLIOGRAFIA	157

Elenco delle tabelle

1.1	Stima della popolazione totale, per Provincie (2000–2007)	12
1.2	Divisione politico amministrativa (2006)	13
1.3	Copertura di vaccinazione di routine nei bambini al di sotto di 1 anno (2000–2007)	16
1.4	Casi clinici e tassi di letalità da malaria (2003–2007).	20
1.5	Dipendenti pubblici nel settore sanitario in Angola per Provincia.	29
3.1	Schema di interpretazione degli aloni di inibizione	89
3.2	Posologia e via di somministrazione dei farmaci anti-tubercolari di prima scelta	98
3.3	Conversione binaria delle reazioni dei microrganismi sconosciuti sulle striscette di API 20 E (bioMérieux)	116
3.4	Conversione ottale del codice binario	116
3.5	Classificazione dei protozoi intestinali di interesse umano	121
3.6	Classificazione degli elminti intestinali di interesse umano	126
3.7	Classificazione dei protozoi ematici e/o tissutali di interesse umano	133
3.8	Classificazione degli elminti ematici e/o tissutali	141
4.1	Valutazione Esterna Qualità 2010–2011.	154

Elenco delle figure

1.1	Stime della popolazione per Provincia nel 2005	14
1.2	Valori medi 2000–2005 della fertilità e speranza di vita in Angola e nelle altre regioni	15
1.3	Coefficiente di letalità della malaria (2003–2007)	20
1.4	L’endemia della malaria non è uguale per tutte le provincie del paese	21
1.5	Prevalenza della tubercolose polmonare (2003–2007)	22
1.6	Coefficiente di letalità da tubercolosi polmonare (2003–2007)	22
1.7	Medici e professionisti sanitari	27
1.8	Indicatori sanitari	27
1.9	Mappa della Provincia di Huambo [14]	30
2.1	Modello di un sistema di laboratorio clinico	35
2.2	Il laboratorio clinico come sottosistema dell’ambiente	36
2.3	I tre elementi necessari per un incendio	50
3.1	Superficie di una piastra di agar inoculata con un campio- ne contenuto in un’ansa per inoculazione, che si effettua toccando, come prima operazione, la superficie dell’agar in corrispondenza di una piccola zona, quindi strisciandola con un movimento alternato secondo un andamento come quello mostrato in figura 3.2	59
3.2	Strisciatura per l’inoculazione di campioni su piastre per cultura allo scopo di ottenere colonie batteriche isolate	59
3.3	Piastre per cultura che illustrano l’esecuzione della stri- sciatura di campioni per i quali si deve condurre una conta batterica semiquantitativa	59
3.4	Colorazione di Gram	69
3.5	Test della coagulasi	73
3.6	Test di solubilità nella bile per l’identificazione di <i>Strepto- coccus pneumoniae</i> su agar sangue	75

3.7	Suscetibilità all'optochina per l'identificazione di <i>Streptococcus pneumoniae</i> su agar sangue	81
3.8	Coltura di <i>Staphylococcus aureus</i>	84
3.9	<i>Streptococcus pyogenes</i> su Agar sangue	86
3.10	<i>Streptococcus pneumoniae</i> su agar sangue	87
3.11	Metodo di Kirby-Bauer: aloni di inibizione su agar Müller-Hinton	90
3.12	E-test per <i>Proteus vulgaris</i> su agar Müller-Hinton. La MIC dell'isolato è letta dove la linea dell'inibizione di crescita incrocia la striscia	91
3.13	All'osservazione microscopica del vetrino con l'obiettivo 100× ad immersione in olio; i batteri acido-alcool resistenti si vedono rossi in campo azzurro.	96
3.14	Farmaci anti-tubercolari di prima scelta	102
3.15	<i>Entamoeba histolytica</i> : trofozoite con emazie fagocitate	123
3.16	<i>Entamoeba histolytica/dispar</i> : cisti mononucleata	124
3.17	<i>Giardia intestinalis</i> : trofozoite	124
3.18	<i>Giardia intestinalis</i> : cisti	125
3.19	Uovo di <i>Schistosoma mansoni</i>	129
3.20	Uovo di <i>Schistosoma haematobium</i>	129
3.21	Uova larvate di <i>Enterobius vermicularis</i>	130
3.22	Uovo di <i>Ascaris lumbricoides</i>	130
3.23	Uova di <i>Taenia</i> spp.	131
3.24	Uovo di <i>Hymenolepis nana</i>	131
3.25	Uovo di <i>Ancylostoma duodenale</i>	132
3.26	Larva di <i>Strongyloides stercoralis</i>	132
3.27	Caratteristiche morfologiche dei parassiti malarici in strisci ematici sottili	137
3.28	Striscio sottile Giemsa 1000×. <i>Plasmodium falciparum</i> : trofozoiti	138
3.29	Striscio sottile Giemsa 1000×. <i>Plasmodium falciparum</i> : gametocita	138
3.30	Tripomastigoti di <i>Trypanosoma brucei gambiense/rhodesiense</i>	140
3.31	Striscio sottile Giemsa 1000×. <i>Loa loa</i> : Microfilaria	144
3.32	Striscio sottile Giemsa 1000×. <i>Wuchereria bancrofti</i> : Microfilaria	145

Capitolo 1

INTRODUZIONE

1.1 Demografia dell'Angola

La Repubblica di Angola ha una superficie di 1.246.700 km², con una popolazione stimata, nel 2007, in 16.527.000 di abitanti (tab. 1.1) [1], con il 50% della popolazione minore di 15 anni; solo il 2% della popolazione ha un'età maggiore o uguale a 65 anni [2].



La densità media è di 12,86 abitanti per km² [1]. Il tasso di fertilità è di 6–7 figli per ogni donna. Nel 2007, l'accrescimento annuale della popolazione è stato di 2,9% [3]. L'Angola ha 18 Provincie, 163 Municipi e 547 Comuni (tab. 1.2) [1]. La popolazione angolana è caratterizzata da un numero eterogeneo di gruppi etnici, con le rispettive culture, tradizioni, lingue e comportamenti. Il 53,3%

della popolazione è concentrata nelle zone urbane [3].

Dal 1961 al 2002 l'Angola è stata teatro di guerra¹: prima, nel perio-

¹Dopo l'indipendenza, i tre movimenti (Fronte Nazionale di Liberazione dell'Angola "FNLA", Movimento Popolare di Liberazione dell'Angola "MPLA" e Unione Nazionale per l'Indipendenza Totale dell'Angola "UNITA") che avevano prima combattuto insieme, si misero a combattere l'uno contro l'altro per conquistare il potere. L'FNLA, nel tempo, ha smesso, e l'MPLA, con l'appoggio dell'Unione Sovietica e soprattutto, di Cuba, ha assunto il potere. L'UNITA, appoggiata dagli USA, dal Sud-Africa e da qualche altro paese africano, combatteva contro l'MPA. Due accordi di pace fatti e falliti: il 31/05/1991, gli accordi di Bicesse (Portogallo) ed il 20/09/1994, gli accordi di Lusaka (Zambia). Dopo l'uccisione del fondatore dell'UNITA in guerra, il 22 febbraio 2002, fu fatto un altro accordo (complementare agli accordi di Lusaka), il 04 aprile 2002, che portò la pace. Questo giorno viene commemorato come *il giorno della pace e della riconciliazione nazionale*. Questa pace non è però estesa a tutta l'Angola, in quanto in una Provincia, l'enclave di Cabinda con meno di 1.000.000 di abitanti, maggior produttore di petrolio angolano, nel 1975, è insorto un altro movimento indipendentista, il Fronte per la Liberazione dell'Enclave di Cabinda (FLEC), che combatte per l'indipendenza dall'Angola.

Tabella 1.1: Stima della popolazione totale, per Provincie (2000–2007)

Provincia	Popolazione stimata							
	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007
Bengo	214.000	220.000	227.000	234.000	241.000	248.000	256.000	264.000
Benguela	808.000	833.000	858.000	884.000	911.000	939.000	967.000	997.000
Bié	1.441.000	1.485.000	1.530.000	1.576.000	1.625.000	1.674.000	1.725.000	1.777.000
Cabinda	224.000	231.000	238.000	245.000	253.000	260.000	268.000	276.000
Cunene	287.000	296.000	305.000	314.000	324.000	333.000	344.000	354.000
Huambo	1.948.000	2.007.000	2.068.000	2.131.000	2.196.000	2.262.000	2.351.000	2.402.000
Huíla	1.074.000	1.107.000	1.140.000	1.175.000	1.211.000	1.248.000	1.285.000	1.325.000
K. Kubango	156.000	161.000	166.000	171.000	176.000	182.000	187.000	193.000
Kwanza Norte	495.000	510.000	526.000	542.000	558.000	575.000	593.000	611.000
Kwanza Sul	799.000	824.000	849.000	874.000	901.000	928.000	957.000	986.000
Luanda	2.276.000	2.346.000	2.417.000	2.490.000	2.566.000	2.644.000	2.724.000	2.807.000
Lunda Norte	360.000	371.000	383.000	394.000	406.000	418.000	431.000	444.000
Lunda Sul	186.000	191.000	197.000	203.000	209.000	216.000	222.000	229.000
Malange	1.148.000	1.183.000	1.219.000	1.256.000	1.295.000	1.334.000	1.374.000	1.416.000
Moxico	405.000	418.000	430.000	443.000	457.000	471.000	485.000	500.000
Namibe	173.000	179.000	184.000	190.000	195.000	201.000	208.000	214.000
Uíge	1.109.000	1.143.000	1.177.000	1.213.000	1.250.000	1.288.000	1.327.000	1.368.000
Zaire	295.000	304.000	313.000	323.000	333.000	343.000	353.000	364.000
TOTAL	13.398.000	13.809.000	14.227.000	14.658.000	15.107.000	15.564.000	16.059.000	16.527.000

Tabella 1.2: Divisione politico amministrativa (2006)

Provincie	Municipi	Comuni	Superficie km²	Densità abit/km²
Bengo	8	33	31.371	8,16
Benguela	9	36	31.788	30,42
Bié	9	39	70.314	24,53
Cabinda	4	12	7.270	36,86
Cunene	6	20	89.342	3,85
Huambo	11	37	34.274	68,01
Huíla	13	36	75.002	17,13
K. Kubango	9	31	199.049	0,93
Kwanza Norte	10	31	24.190	24,51
Kwanza Sul	12	36	55.660	17,19
Luanda	9	30	2.418	1126,55
Lunda Norte	9	26	102.783	4,19
Lunda Sul	4	14	45.649	4,86
Malange	14	50	97.602	14,07
Moxico	9	31	223.023	2,17
Namibe	5	14	58.137	3,58
Uíge	16	48	58.698	22,61
Zaire	6	23	40.130	8,80
TOTAL	163	547	1.246.700	12,86

do 1961–1975, per l'indipendenza dal colonialismo portoghese dopo 500 anni di colonizzazione e poi, il conflitto diviene guerra civile nel periodo 1975–2002 per la conquista del potere politico. Questo lungo periodo di guerra ha avuto delle forti ripercussioni sulla struttura demografica del paese [2]. Una grande parte della popolazione è stata costretta ad abbandonare la sua area di origine, provocando l'esodo delle popolazioni dalle zone rurali in direzione delle città, creando enormi aggregati urbani, fondamentalmente nella fascia litorale in tutta la sua estensione ma, soprattutto, nella Provincia della capitale del paese, Luanda. La crescita urbana irregolata, associata a questi spostamenti della popolazione, ha provocato una grande pressione sulle infrastrutture sociali e sull'ambiente, accentuando il fenomeno della povertà.

L'Instituto Nacional de Estatística (INE) ha pubblicato, nel 2005, la stima della popolazione urbana di Luanda riferita all'anno 1991: questa risulta essere circa il 17% della popolazione totale, cioè circa 3.000.000 di abitanti (fig. 1.1). Tuttavia, c'è la possibilità che questi valori siano sotto-stimati e che, in realtà, si tratti di 4–5.000.000 di abitanti e, di conseguenza, la popolazione di Luanda rappresenterebbe più del 30% della popolazione totale.

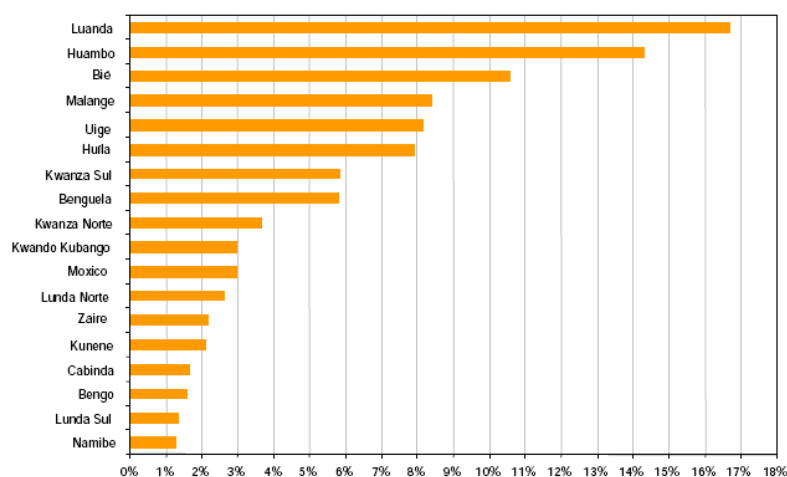


Figura 1.1: Stime della popolazione per Provincia nel 2005

L'Angola presenta, contemporaneamente, uno dei maggiori tassi di fertilità al mondo (oltrepassata solamente dalla Nigeria e dalla Somalia), e uno dei valori più bassi della speranza di vita (fig. 1.2).

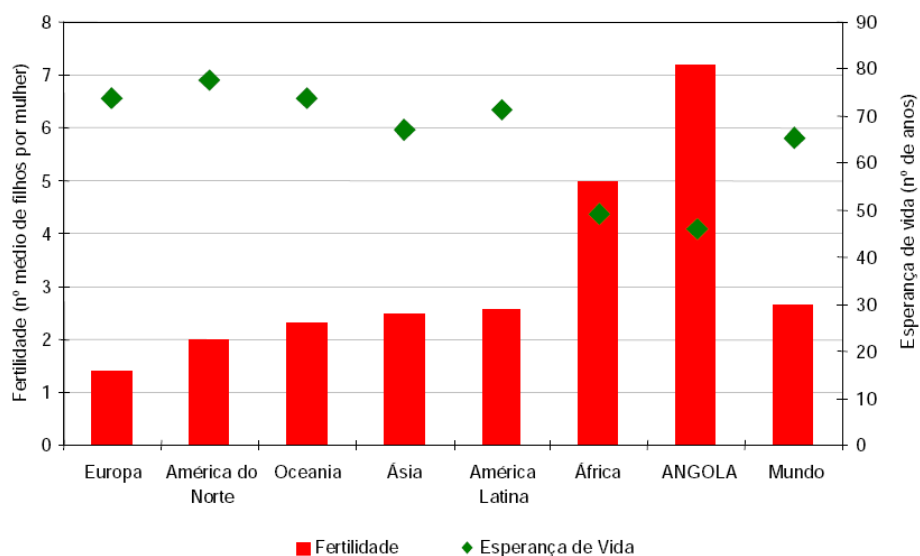


Figura 1.2: Valori medi 2000–2005 della fertilità e speranza di vita in Angola e nelle altre regioni

1.2 Profilo sanitario

La situazione della sanità della popolazione angolana è stata resa fragile dalla guerra, che ha distrutto o danneggiato gravemente le reti di infrastrutture sanitarie e di trasporti, rendendo difficile l'accesso ai servizi. Ci sono anche altri fattori che contribuiscono a creare l'attuale situazione, come la povertà generalizzata, l'indisponibilità di acqua potabile, le cattive condizioni igieniche, la mancanza di informazioni e l'inadeguatezza della rete di distribuzione di alimenti.

Lo stato di sanità degli angolani è caratterizzato da una bassa speranza di vita² (fig. 1.2) e da un elevato tasso di morbidità e mortalità. I tassi di

²Nel 2003, la speranza di vita alla nascita era di 46 anni. La probabilità di un individuo alla nascita, di non sopravvivere oltre i 40 anni era del 41,6%.

mortalità dei bambini minori di 1 anno e di 5 anni sono tra i più elevati del mondo, situandosi, nel 2001, in 150 e 250 morti per ogni 1.000 bambini, rispettivamente [2]; anche il tasso di mortalità materna è uno dei più elevati nel mondo, nel 2005 era stimato in 1.400/100.000 [3]. Nel 2009, è stato registrato un miglioramento: la mortalità dei bambini al di sotto di 1 anno è stata di 116/1.000 e al di sotto di 5 anni è stata di 194/1.000 e quella materna è stata di 600/100.000 [4].

Le principali cause di morte materna [2] sono:

- malaria
- emorragia
- aborti e complicazioni durante il parto.

L'assistenza prestata dal servizio sanitario è insufficiente. La malnutrizione cronica affligge il 45% dei bambini al di sotto dei 5 anni. Nel 2007, l'88 % dei bambini al di sotto di 1 anno risultava vaccinato contro il morbillo (tab. 1.3) [1]. Solo il 40% della popolazione ha accesso ai servizi sanitari, e solo il 45% delle nascite è assistito da personale qualificato [3]. Il tasso di accesso all'acqua potabile nel 2003 era di 32% [2].

Tabella 1.3: Copertura di vaccinazione di routine nei bambini al di sotto di 1 anno (2000–2007)

Vacina	2000	2003	2004	2005	2006	2007
BCG	56%	62%	72%	61%	65%	88%
OPV-3 (VOP)	33%	45%	57%	41%	44%	83%
DTP-3/PENTA-3	31%	46%	59%	47%	40%	83%
SARAMPO	35%	62%	64%	45%	48%	88%
F.AMARELA	29%	53%	60%	44%	43%	52%
TT-2+Grávidas	37%	72%	72%	53%	56%	80%

Le principali cause di morte nella popolazione sono [2, 5]:

- malaria
- diarrea
- infezioni respiratorie
- anemie
- morbillo
- malnutrizione.

Le malattie trasmissibili, come la malaria, l'AIDS, la tubercolosi e la tripanosomiasi sono causa del 70% dei decessi [3].

L'Angola ha anche un numero elevato di persone (40.000–70.000) affette da mutilazioni risultanti da incidenti causati dall'esplosione di mine anti-uomo [2].

Il sistema sanitario è strutturato in 3 livelli [6]:

1. Il primo livello presta le cure di base, ed è rappresentato dai *centros de saúde, postos de saúde, hospitais municipais, postos de enfermagem e consultórios médicos*; costituiscono il primo contatto della popolazione con il sistema sanitario.
2. Il livello secondo è rappresentato dagli ospedali provinciali e generali ed è il livello di riferimento per le unità del primo livello.
3. Il livello superiore è quello costituito dagli ospedali specializzati nazionali.

Le prestazioni sanitarie vengono eseguite dal settore pubblico, da quello privato e anche dalla medicina tradizionale e si stima che circa il 30–40% della popolazione abbia accesso ai servizi sanitari.

1.2.1 Settore pubblico

Il settore pubblico include il Servizio Nazionale di Sanità (SNS), i servizi sanitari delle Forze Armate Angolane (FAA), del Ministero dell'Interno, di imprese pubbliche come SONAGONL, ENDIAMA, etc. convenzionate con SNS.

Il servizio pubblico è il principale prestatore delle cure sanitarie a livello nazionale. Il SNS e gli altri servizi del settore pubblico hanno le stesse difficoltà (pag. 25) nella prestazione delle cure sanitarie, prive della qualità desiderabile nella maggioranza dei casi.

1.2.2 Settore privato

Il settore privato, a pagamento, si trova nei principali centri urbani del paese. I prezzi delle cure sanitarie limitano l'accessibilità della popolazione al settore privato, e non sono oggetto di alcuna regolazione. Le difficoltà (pag. 25) nelle cure sanitarie sono le stesse di quelle del settore pubblico. Per lo più, il personale del settore privato è lo stesso che lavora nel settore pubblico.

Il settore privato non lucrativo, essenzialmente legato a enti religiosi, e a Organizzazioni Non Governative (ONG) dirigono le cure per le persone più vulnerabili delle zone suburbane e rurali.

Il sistema di fiscalizzazione e di controllo, assai debole, ha favorito l'esistenza di un settore privato informale di prestazioni sanitarie in condizioni inaccettabili, frequentemente praticate da individui senza la minima qualificazione.

1.2.3 Settore della Medicina Tradizionale

La medicina tradizionale si trova ancora in stato di organizzazione precaria. Anche se il numero di pazienti che si rivolgono a questo settore non è noto, ci sono evidenze [7] che rivelano come il numero sia elevato e che, spesso, gli stessi pazienti si rivolgono contemporaneamente anche alla medicina occidentale.

Per carenza di regolamentazione, manca l'integrazione nel sistema nazionale di sanità della medicina tradizionale, cosicché i valori di questa, non giungono a portare beneficio alla popolazione.

I medicinali tradizionali si trovano in vendita nei mercati informali e nelle erboristerie, senza alcun controllo di qualità ed in condizioni inadeguate di conservazione.

Non c'è alcuna regolamentazione sulle medicine tradizionali e omeopatiche importate. Non esiste una Farmacopea Nazionale per le medicine tradizionali. I prodotti forniti da erboristi e da terapeuti tradizionali risultano spesso dalle conoscenze che si trasmettono attraverso le generazioni come tradizione orale familiare. Ciò costituisce un ostacolo per lo studio scientifico dei rimedi e lo sviluppo di questo settore.

1.3 Quadro epidemiologico

Il quadro epidemiologico [2] è caratterizzato da una grande diffusione di malattie trasmissibili e parassitarie, con elevate incidenze di:

- malaria
- malattie respiratorie, soprattutto tubercolosi polmonare.
- malattie diarroiche acute
- HIV
- tripanosomiasi
- lebbra
- schistosomiasi

La malaria, le malattie respiratorie e diarroiche acute rappresentano circa il 90% dei casi di morbidità [2] e il 60% dei casi di mortalità [8].

1.3.1 Malaria

La malaria continua ad essere la principale causa di morbidità e mortalità in Angola [2]. La malattia è endemica in tutto il paese, in alcune provincie è iperendemica (fig. 1.4) [9] e colpisce soprattutto bambini al di sotto dei 5 anni [2]; il 40% dei bambini muore nei primi 5 anni di vita. Molto colpite sono anche le donne in stato di gravidanza. Nel periodo, 2003–2007, è stata registrata una riduzione dei casi clinici, con il livello più basso nel 2006 e del coefficiente di letalità della malaria da 1,2% nel 2003 a 0,3% nel 2007 (tab. 1.4 e grafico 1.3) [1].

Tabella 1.4: Casi clinici e tassi di letalità da malaria (2003–2007).

	Anni				
	2003	2004	2005	2006	2007
Casi notificati	3.246.256	2.489.170	2.329.136	2.283.097	2.726.530
Tasso di letalità	1,2%	0,5%	0,6%	0,4%	0,3%

Tale diminuzione può essere imputata alle campagne informative e alla massiva distribuzione di zanzariere impregnate alla popolazione, specie alla famiglia con bambini piccoli e donne incinte. Inoltre vengono operate disinfestazioni periodiche delle case.

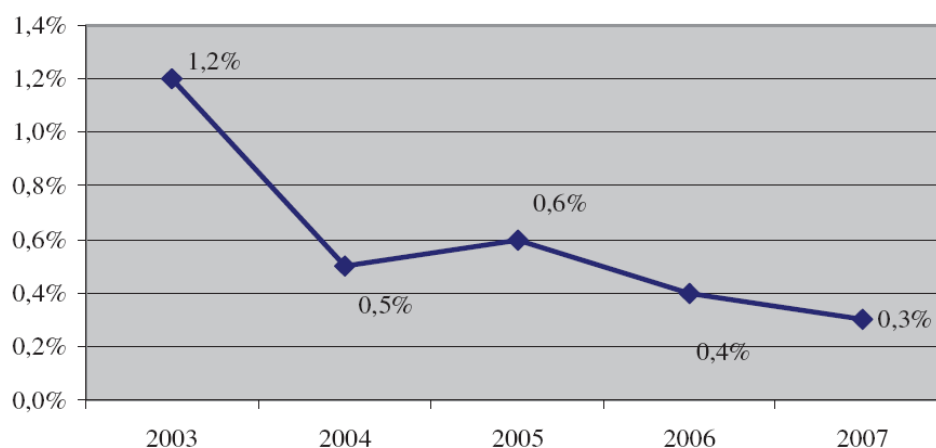


Figura 1.3: Coefficiente di letalità della malaria (2003–2007)

Circa il 24% dei casi di febbre nei bambini minori di 5 anni sono attribuiti alla malaria [6].

Questa malattia è responsabile per circa il 35% dei consulti medici e del 20% di ricoveri ospedalieri, del 40% di morti perinatali e del 25% dei casi di mortalità materna [6]. Negli ospedali, il tasso di mortalità per malaria è circa 15–30% [8]. In generale la prevalenza della malaria è di 146 per ogni 1.000 abitanti [6].

L'agente responsabile della malaria in Angola è principalmente *Plasmodium falciparum* (del 90%). *Plasmodium vivax* è responsabile del 7%, *Plasmodium malariae* del 3%, mentre non è noto il numero di casi attribuibili a *Plasmodium ovale* [9].

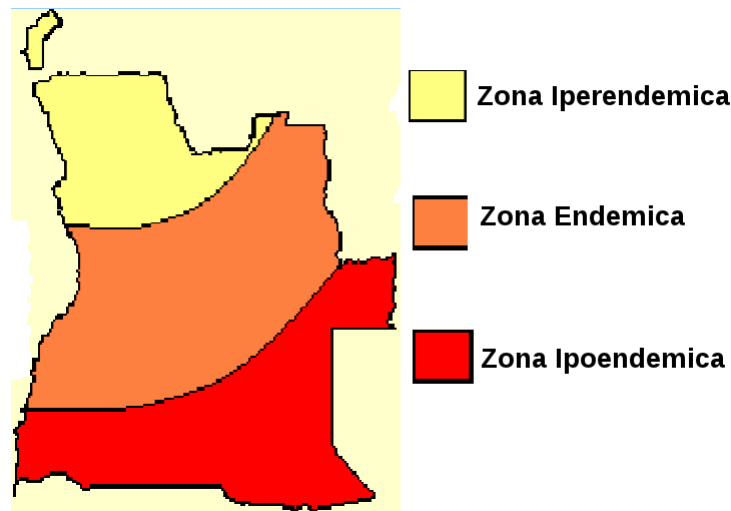


Figura 1.4: L'endemia della malaria non è uguale per tutte le provincie del paese

1.3.2 Tubercolosi polmonare

Nel 2007, sono stati notificati 42.383 casi di tubercolosi nel paese e circa 7.000 nuovi casi vengono diagnosticati annualmente, dei quali circa 6.000 di forma polmonare, nel quale 70% sono BK+.

Nonostante, l'aumento dell'incidenza e della prevalenza, è stata registrata una riduzione del coefficiente di letalità da 3,2% nel 2004 a 2,7% nel 2006 e a 2,4% nel 2007 (grafici 1.5 e 1.6) [1].

Nel 2005, la prevalenza di HIV fra i malatti di tubercolosi in Angola era del 19% [3].

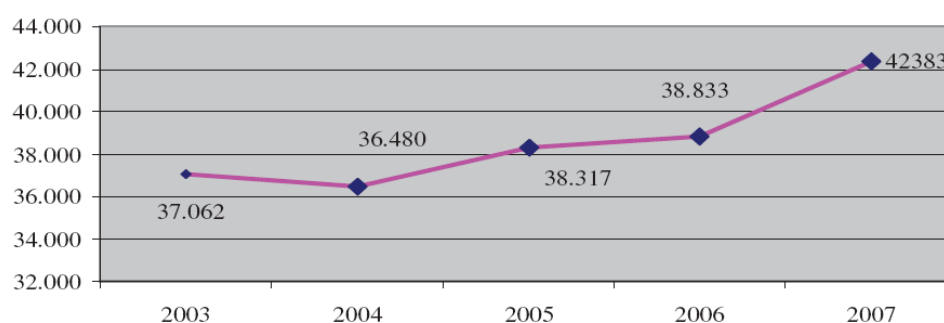


Figura 1.5: Prevalenza della tubercolose polmonare (2003–2007)

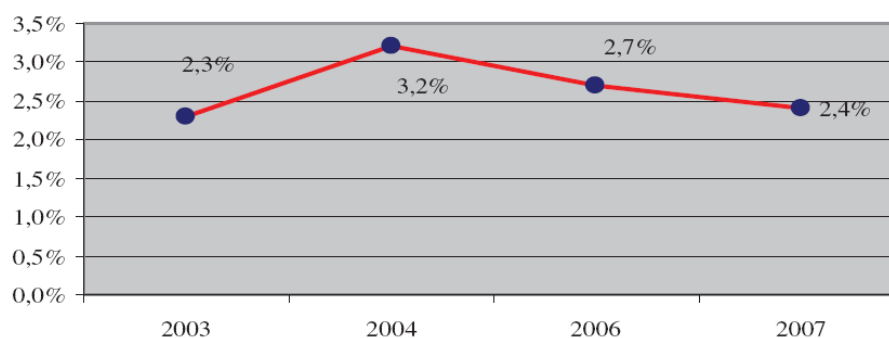


Figura 1.6: Coefficiente di letalità da tubercolosi polmonare (2003–2007)

1.3.3 Malattie diarroiche acute

Le malattie diarroiche acute sono la seconda causa di morbidità e mortalità e la seconda causa di consulto medico. Le diarree riflettono, soprat-

tutto, deficit della fornitura di acqua potabile al domicilio, condizioni igieniche molto scarse, mancanza di infrastrutture di igienizzazione e deficit dell'allattamento materno [2].

1.3.4 HIV

Nel 2009, l'Angola ha avuto un tasso di prevalenza di HIV di 2% [10], con 200.000 adulti infettati. Il primo caso di HIV è stato diagnosticato nel 1985. Durante il periodo della guerra civile (1975–2002) il flusso migratorio vicino alle frontiere era quasi impossibile, impedendo in questo modo la diffusione di HIV/AIDS. Anche se il tasso di prevalenza è relativamente basso, rispetto agli altri paesi della regione subsahariana, con l'aumento della circolazione delle persone e con il ritorno dei profughi dai paesi vicini con tassi di prevalenza superiori, è ipotizzabile che l'HIV possa diffondersi rapidamente per il territorio nazionale [2].

1.3.5 Lebbra

L'Angola, nel 2009, ha notificato 1.154 casi di lebbra e nel 2010, 1.122 casi. Dal 2005 ha raggiunto la meta di eliminazione³, riducendo la prevalenza a 0,93%, da quell'anno fino al momento c'è la tendenza della riduzione [11]. Le provincie con il maggior numero di malati sono [2]:

- Kwanza Sul
- Huíla
- Malange
- Luanda
- Moxico
- Benguela
- Bié

³L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha preconizzato una meta di eliminazione della lebbra, "meno di un caso su ogni 10.000 abitanti".

1.3.6 Tripanosomiasi

Nell'anno 2005 [2], il numero dei malatti è stato stimato intorno agli 80.000–120.000 casi, e circa 4.000.000 di persone sono a rischio di tripanosomiasi, soprattutto nelle aree rurali. Ogni anno, sono diagnosticati circa 3.000 nuovi casi [12].

L'Angola è il secondo paese africano più affetta dalla mosca tsé-tsé [12], dopo la Repubblica Democratica del Congo. Dopo l'Angola ci sono l'Uganda e il Sudan.

La mosca tsé-tsé è presente in 14 provincie delle 18 angolane, ma la malattia è endemica in 7 provincie:

- Kwanza Sul
- Kwanza Norte
- Uíge
- Malange
- Luanda
- Bengo
- Zaire

1.3.7 Schistosomiasi

La schistosomiasi è endemica in circa 13 provincie del paese, il che corrisponde il 72,2% del territorio nazionale [13] e bambini tra 5–14 anni sono quelli più infetti [2].

1.3.8 Epidemie

Negli ultimi anni [3], il paese ha affrontato varie epidemie, come per esempio:

- poliomielite nel 1999, con 1.117 bambini affetti

- meningite nel 2002, con 1.263 casi e 152 morti
- nel 2005, nella Provincia di Uíge si è avuto la più grave epidemia mondiale di febbre di Marbug, con un totale di 252 casi e 227 morti
- dal 2006, l'Angola fronteggia un'epidemia di colera che continua fino ad oggi. Nel 2006 si sono avuti 67.256 casi e 2.722 morti. Nel 2007, 18.390 casi e 515 morti. Nei primi otto mesi del 2008, sono stati registrati 8.788 casi e 209 morti.

1.3.9 Infrastrutture sanitarie

Il quadro sanitario [2] al 2006, presentava delle gravi debolezze, sia a livello delle infrastrutture sia a livello delle risorse umane.

I centri di sanità erano scarsi e concentrati nelle aree urbane. Molti sono stati abbandonati nel periodo delle guerre; recentemente, ne sorgono di nuovi, per iniziativa privata, molti dei quali non abilitati e privi dei requisiti alla pratica sanitaria.

In Angola nel 2006 c'erano:

- 27 ospedali nazionali e provinciali, 10 dei quali sono localizzati a Luanda.
- 291 centri di sanità e ospedali municipali.
- 934 *postos de saúde*⁴

Si stima che solo il 30–40% della popolazione avesse l'accesso alle strutture sanitarie in condizioni funzionanti, localizzate a meno di 5 km dal luogo di residenza.

Una parte delle infrastrutture e degli equipaggiamenti in stato avanzato di degrado per mancanza di manutenzione (secondo i dati del 2006, circa 40 centri di sanità e 209 *postos de saúde* non erano più in funzione, soprattutto per problemi per mancanza di tecnici qualificati e mancanza di un

⁴Assimilabili ad ambulatori.

sistema di fornitura regolare) sono stati oggi recuperati e adesso sono funzionanti. La situazione delle strutture è migliorata in quanto è aumentato il numero degli ospedali e dagli ambulatori, tuttavia è ancora assolutamente insufficiente.

I rifiuti ospedalieri continuano a causare gravi conseguenze per l'ambiente e per la salute umana, per mancanza di un sistema adeguato di gestione e di trattamento. In questo modo, è frequente che proprio gli ospedali e i centri di sanità contribuiscono loro stessi alla disseminazione delle malattie alla comunità.

La guerra non ha solamente distrutto la rete di infrastrutture, ma ha influito negativamente sulla regolare distribuzione territoriale dei professionisti della sanità. Inoltre, ha impedito l'istruzione di nuovi operatori sanitari. Nel 2006 si stimava che l'Angola avesse circa 30.000 lavoratori nella sanità, essendo la maggioranza costituita da personale amministrativo e ausiliario, e solamente da poco più di 1.000 medici (fig. 1.7), dei quali il 25% stranieri. Questo vuol dire un rapporto di 14.000 persone per ogni medico, ossia 7 medici per ogni 100.000 abitanti (fig. 1.8), valore molto inferiore rispetto a quello valutato per la media della regione subsahariana per l'anno 2001, di 32 medici per ogni 100.000 abitanti.

Circa il 70% dei medici si trovava a Luanda. Centinaia di località non disponevano di alcun servizio medico.

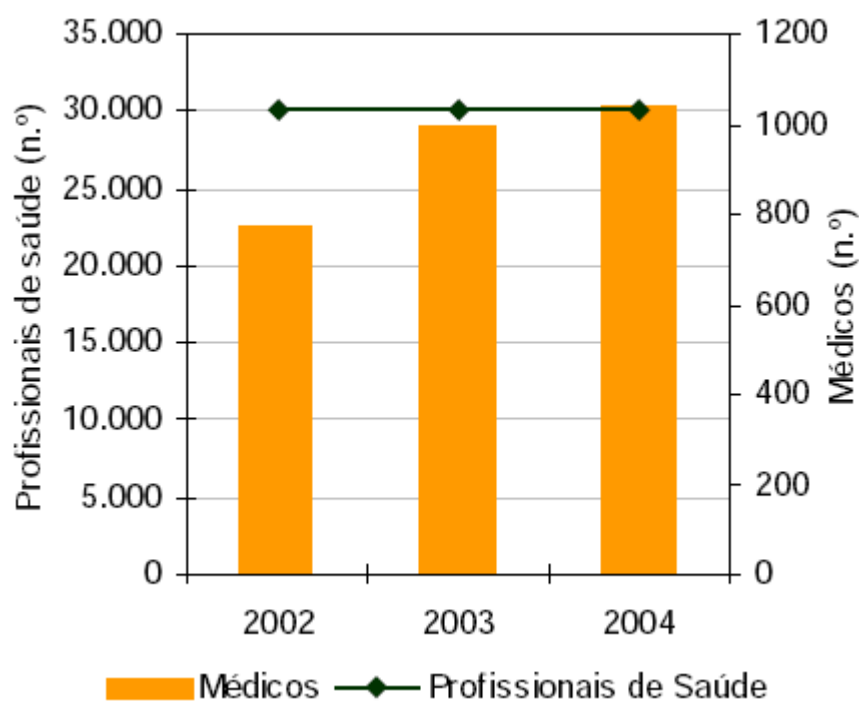


Figura 1.7: Medici e professionisti sanitari

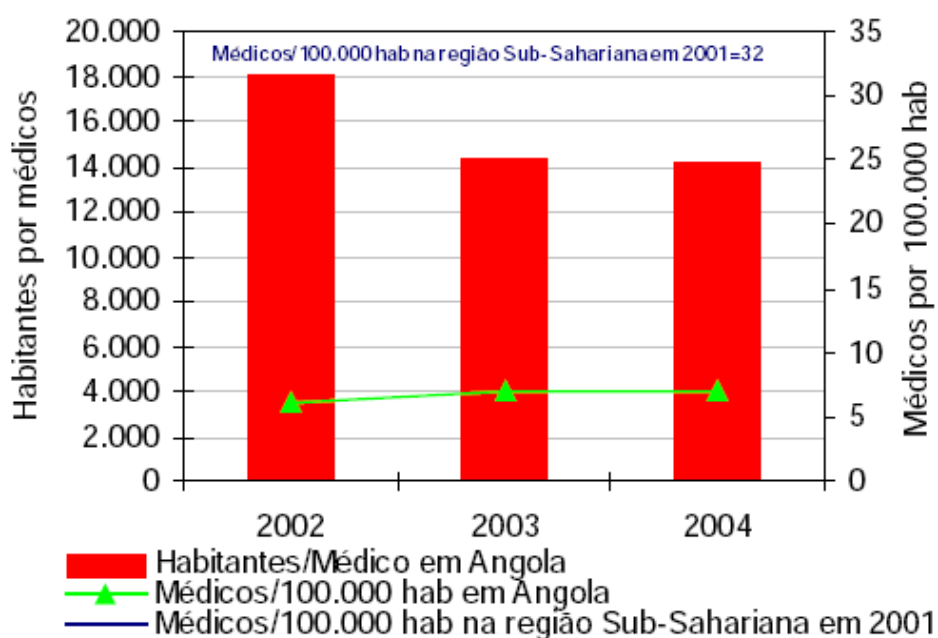


Figura 1.8: Indicatori sanitari

La stima del 2009 [14] indica che il settore pubblico sanitario dell'Angola impiega circa 67.000 persone, dei quali approssimativamente 38.000 sono professionisti sanitari (esclusi gli amministratori e gli ausiliari). La tabella 1.5 rappresenta il numero dei medici, infermieri e tecnici del settore pubblico per Provincia nel 2009. Il numero dei medici è cresciuto più del triplo, 845 nel 2005 e 2.956 nel 2009. I dati disponibili nel relatorio del Ministero Nazionale di Sanità dell'Angola del 2009, indicano che il numero dei medici presenta un accrescimento costante e accentuato dal 2005, con 1.525 medici nel 2007, 1.899 nel 2008. Anche il numero degli infermieri è aumentato enormemente dal 2005, da 16.037 a 29.605 nel 2009. Nel 2005 non c'erano dati disponibili relativi al numero dei tecnici. Il coefficiente totale di impiegati dell'area sanitaria per ogni 1.000 abitanti in Angola si avvicina al valore raccomandato dall'Organizzazione Mondiale di Sanità (OMS), che è di 2,28 funzionari per ogni 1.000 abitanti (OMS 2006). Tuttavia, permane una cattiva distribuzione di impiegati sanitari nel paese (tab. 1.5).

Tabella 1.5: Dipendenti pubblici nel settore sanitario in Angola per Provincia.

Provincia	Medici ^a		Infermieri		Tecnici		Totale	
	N°.	N° per 1.000 abit.	N°	N° per 1.000 abit.	N°	N° per 1.000 abit.	N°	N° per 1.000 abit.
Bengo	87	0,41	954	4,49	99	0,47	1.140	5,36
Benguela	184	0,09	2.809	1,37	391	0,19	3.384	1,65
Bié	106	0,18	1.468	2,45	80	0,13	1.654	2,76
Cabinda	126	0,29	1.256	2,90	278	0,64	1.660	3,83
Cunene	103	0,28	922	2,51	73	0,20	1.098	2,99
Huambo	163	0,17	1.796	1,89	343	0,36	2.302	2,42
Huíla	187	0,10	2.052	1,11	495	0,27	2.734	1,48
K. Kubango	39	0,13	642	2,14	65	0,22	746	2,49
Kwanza Norte	115	0,46	1.051	4,20	88	0,35	1.254	5,02
Kwanza Sul	182	0,19	1.026	1,08	131	0,14	1.339	1,41
Luanda	982	0,22	8.750	1,97	2.590	0,58	12.322	2,78
Lunda Norte	94	0,16	839	1,40	89	0,15	1.022	1,70
Lunda Sul	87	0,33	753	2,90	67	0,26	907	3,49
Malange	147	0,33	1.146	2,55	82	0,18	1.374	3,06
Moxico	81	0,14	1.233	2,06	93	0,16	1.407	2,35
Namibe	103	0,56	941	5,13	257	1,40	1.301	7,10
Uíge	94	0,10	1.222	1,36	132	0,15	1.448	1,61
Zaire	76	0,38	732	3,66	82	0,41	890	4,45
TOTAL	2.956	0,17	29.592	1,74	5.435	0,32	37.983	2,24

^a Incluso medici stranieri.

1.4 Scopo della tesi: progetto di allestimento di un Laboratorio di Microbiologia nella Provincia di Huambo

1.4.1 Situazione sanitaria della Provincia di Huambo

Huambo (fig: 1.9), è una delle 18 provincie angolane. Si trova nel centro dell'Angola, in un altopiano, con una superficie di 34.274 km², e una popolazione stimata in 2.402.000 abitanti (tab. 1.1) [1]. Prima della guerra coloniale era la Provincia più popolata del paese. Huambo è una delle provincie che sono state più colpite dalla guerra civile.

La Provincia di Huambo è costituita da 11 Municipi e da 37 Comuni (tab. 1.2), e ha una densità popolazione di 68,83 abit/km² [1]; ogni Comune è costituita da diversi villaggi.

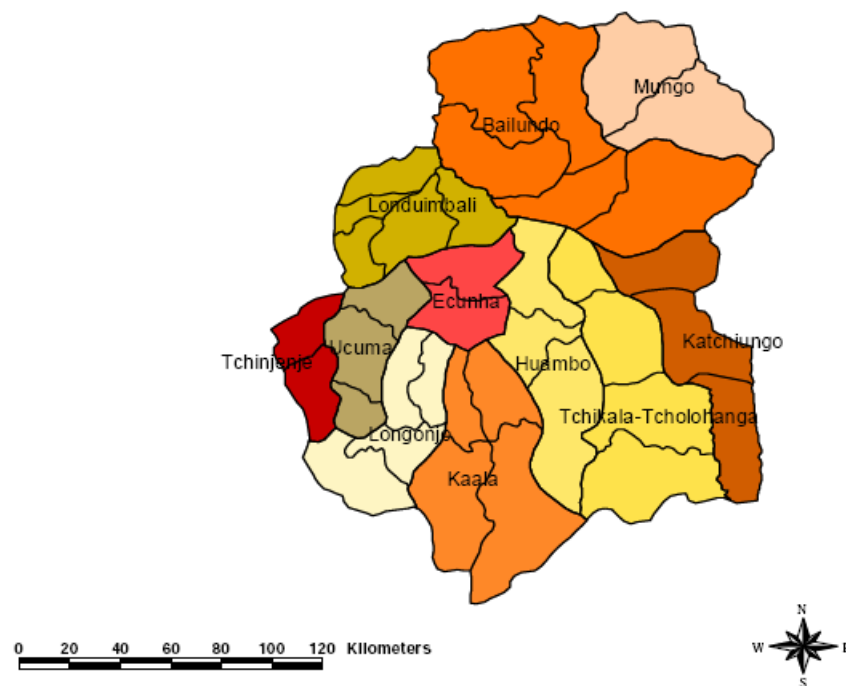


Figura 1.9: Mappa della Provincia di Huambo [14]

La Provincia ha 10 ospedali municipali, un ospedale generale e un sanatorio, 51 centri di sanità e 130 *postos de saúde* [15, 16].

Il servizio sanitario a Huambo è assicurato da 5.231 funzionari [15], fra questi 163 medici tra nazionali e stranieri, 1.796 infermieri e 343 tecnici (tab. 1.5) [14]; il restante è il personale amministrativo ed ausiliario.

1.4.2 *Hospital Geral do Huambo*

L'Ospedale Generale è la maggiore unità di riferimento a livello Provinciale [16]; si trova nel capoluogo, il Comune di Huambo con il nome omonimo della Provincia. Ha una capacità di circa 800 posti letto [17], dà lavoro a 76 medici, tra nazionali e stranieri, 395 infermieri e 265 tecnici [18]. Ogni giorno nell'Ospedale Generale di Huambo vengono visitati circa 700 pazienti che vengono non solo dalla Provincia di Huambo, ma anche dalle provincie vicine, come Bié, Kwanza Sul, Kuando Kubango, Huíla e Benguela [18, 19].

L'Ospedale Generale di Huambo da gennaio a dicembre dell'anno 2010 ha effettuato 229.911 consulti per varie patologie; 50.181 sono stati i ricoveri; 2.285 i decessi per malaria, malattie diarroiche, malattie respiratorie acute, politraumatismo, etc. Il tasso di mortalità, nel 2010, nell'Ospedale Generale è stato calcolato di 4,6% [18].

L'Ospedale Generale di Huambo comprende i reparti di:

- medicina generale
- oftalmologia
- chirurgia
- otorinolaringoiatria
- ortopedia
- stomatologia
- pediatria
- cardiologia
- ginecologia e ostetricia
- terapia intensiva
- neonatologia
- emoterapia
- psichiatria
- laboratorio

Laboratorio

In questo laboratorio vengono fatti alcuni esami di base come:

- Emogramma
- Colesterolo
- Ematocrito
- Test di Widal
- Goccia spessa
- Ra-Test
- Glicemia
- Test per l'HIV
- Velocità di eritrosedimentazione (V.E.S)

1.4.3 *Hospital Sanatorio do Huambo*

L'Ospedale Sanatorio di Huambo si trova accanto all'Ospedale Generale e ha la capacità di ricoverare 200 pazienti [19]; offre lavoro a 186 funzionari tra medici, infermieri, tecnici, lavoratori amministrativi e ausiliari. Questo ospedale, dal gennaio a dicembre del 2010 ha diagnosticato 1.033 casi di tubercolosi, ed ha registrato 332 decessi da tubercolosi, polmonite e AIDS.

L'Ospedale assiste ogni giorno circa 60–70 pazienti che vengono non solo dalla Provincia di Huambo, ma anche dalle provincie vicine come: Bié, Kwanza Sul, Kuando Kubango e Huíla.

1.4.4 Motivazione del progetto

In tutta la Provincia di Huambo non esiste un Laboratorio di Microbiologia. La necessità di un servizio di questo tipo risulta ben chiara dai dati sudesposti.

Il personale medico del luogo lamenta la mancanza del supporto laboratoristico.

Il presente lavoro di tesi è scaturito dalle osservazioni del candidato e dalla sua aspirazione a costruire un Laboratorio di Microbiologia che possa colmare le lacune diagnostiche presenti a Huambo, tenendo conto della situazione logistica ed economica della Provincia. In questa ottica, il tirocinio svolto per la stesura di questa tesi ha cercato di focalizzare l'attenzione sulle tecniche di base, in modo da fornire risposte semplici, rapide, e il più possibile a basso costo, ai quesiti diagnostici più frequenti nella situazione sanitaria locale.

In un secondo periodo tale laboratorio potrebbe diventare anche un luogo di tirocinio per la formazione dei tecnici di laboratorio nel campo della microbiologia.

Capitolo 2

ORGANIZZAZIONE E SUPERVISIONE DI UN LABORATORIO CLINICO

2.1 Dai sistemi chiusi a quelli aperti

I sistemi possono essere definiti come chiusi o aperti. Un sistema i cui limiti non siano influenzabili dall'ambiente si definisce un sistema chiuso. Un sistema che continuamente interagisce con l'ambiente è un sistema aperto. Il laboratorio riceve input dall'ambiente intra ed extra ospedaliero sotto forma di campioni, informazioni, reagenti, scorte, risorse umane e strumenti. Con l'attività dei laboratoristi e dei tecnici i materiali, le informazioni, gli input vengono trasformati in output di risultati clinici che vengono utilizzati nella diagnosi dei pazienti (fig. 2.1).

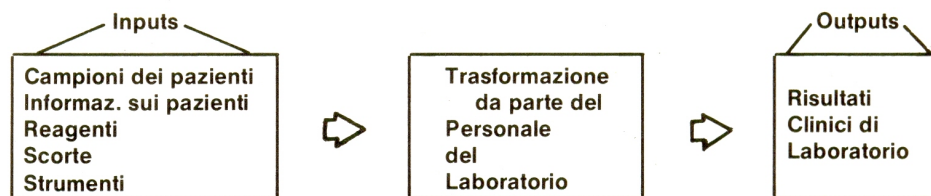


Figura 2.1: Modello di un sistema di laboratorio clinico

2.1.1 Il laboratorio clinico come sottosistema

Nella teoria generale dei sistemi, l'organizzazione viene vista come un sottosistema di un più vasto sistema: "l'ambiente" (fig. 2.2). Dal punto di vista di un sistema aperto, l'organizzazione del laboratorio dipende per la sua sopravvivenza e per l'efficienza del suo servizio dal "suo" ambiente; è più difficile studiare secondo la prospettiva di sistema aperto che secondo quella di sistema chiuso. È semplice infatti studiare il laboratorio come un sistema chiuso, concentrarsi sulle sue operazioni interne ed eliminare i fattori ambientali ma, in seguito alle molte influenze dell'ambiente, si deve considerare il concetto di sistema aperto per evitare conclusioni errate circa questo tipo di organizzazione. Infatti, dal momento in cui il laboratorio clinico non può accettare tutti i possibili input provenienti dall'ambiente, non è più completamente aperto; esso deve selezionare gli input che riceve, le trasformazioni che realizza e gli output che produce, deve stabilire un

determinato “campo di attività” e dei confini che lo separino dall’ambiente esterno.

Le forze del sistema ambientale hanno un effetto diretto sul modo in cui il sottosistema del laboratorio clinico struttura le sue attività. Quando le forze ambientali diventano più complesse ed eterogenee, il sottosistema del laboratorio deve diventare sensibile a nuovi bisogni, scopi ed ispirazioni dell’ambiente.

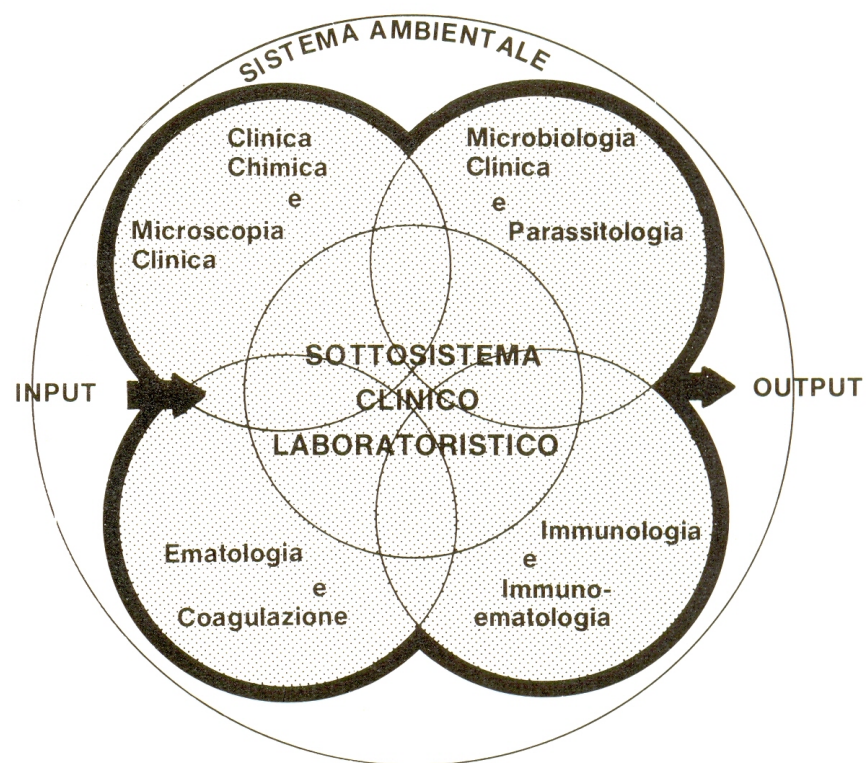


Figura 2.2: Il laboratorio clinico come sottosistema dell’ambiente

2.2 Organizzazione e definizione di modelli dinamici di lavoro

L'organizzazione e la definizione di modelli dinamici di lavoro nel laboratorio prevedono la messa in atto delle funzioni basilari del management. Tali funzioni, correlate fra loro e in parte sovrapponibili, possono non essere svolte nella esatta sequenza e i singoli elementi possono tendere a perdere la loro identità nella realizzazione dei compiti giornalieri:

1. **Pianificare:** decidere cosa deve essere fatto e determinare quale sia il miglior modo per farlo. Gli elementi essenziali sono:
 - capire il tipo di incarico
 - impostare un programma che risponda alle domande: cosa debba essere fatto, dove deve essere fatto, quando, chi lo farà, come sarà fatto e perché si debba fare.
2. **Organizzare:** correlare risorse umane e materiali per definire un programma nella maniera più efficiente possibile.
3. **Coordinare:** attuare un processo di intercomunicazione tra coloro che lavorano immediatamente all'interno e all'esterno dell'area di controllo del supervisore, così da ottenere la loro collaborazione per quegli aspetti che influenzano o sono influenzati dall'attività del supervisore stesso.
4. **La direzione:** è un processo per cui vengono rese effettive le attività programmate nelle quali vengono utilizzate risorse materiali e umane.
5. **Il controllo:** permette di confrontare le attività svolte secondo criteri misurabili, così da verificare l'accordo con il programma. Il lavoro deve essere interpretato attraverso i risultati.

L'applicazione delle funzioni manageriali costituisce una delle fasi più importanti nella dinamica del lavoro in un laboratorio. Ognuna delle seguenti fasi nel processo di dinamica lavorativa presenta un certo numero di sottofasi:

1. Raccolta e distribuzione dei campioni
2. Accettazione dei campioni e loro ingresso nel sistema
3. Esecuzioni degli esami
4. Registrazione e presentazione dei risultati.

È importante organizzare un metodo per l'accettazione dei campioni:

1. Identificazione e verifica
2. Assegnazione di numeri di riconoscimento al campione e al modulo di richiesta
3. Compilazione dei fogli di registrazione e di quelli riguardanti l'esecuzione degli esami
4. Preparazione e trattamento del campione.

2.3 L'utilizzo dello spazio

Un uso appropriato dello spazio disponibile nel laboratorio migliora l'efficienza della prestazione lavorativa. Il supervisore dovrebbe analizzare la disposizione delle aree di lavoro nella sezione e determinare se possono essere apportati dei miglioramenti.

La valutazione sull'utilizzo dello spazio prevede alcune considerazioni:

1. Le caratteristiche strutturali e architettoniche dell'area
2. La natura delle procedure eseguite, l'uso in termini quantitativi degli strumenti e/o le fasi manuali necessarie alla attuazione degli esami
3. Lo spazio necessario, i metodi usati e le norme di sicurezza richieste.

2.3.1 Caratteristiche strutturali del laboratorio

Il supervisore può variare solo in minima parte le caratteristiche strutturali e architettoniche dell'area lavorativa. La disposizione strutturale della sezione è indubbiamente fissa, e l'andamento del lavoro viene ad essere organizzato di conseguenza.

La sede ed il numero delle prese di corrente elettrica, dei rubinetti e di altri elementi utili, sono fattori da considerare quando si decide la disposizione delle aree di lavoro. L'altezza dei banchi, la quantità di superfici di lavoro disponibili, la sede ed il numero dei servizi igienici sono fattori altrettanto importanti. Gli spazi liberi e le distanze tra i banchi e le sedi di lavoro prevedono il collocamento di una strumentazione fissa e la preparazione di uno schema per il suo utilizzo.

Se la struttura di base dell'area risulta appropriata, i problemi riguardanti l'organizzazione delle varie fasi lavorative vengono a ridursi.

Si deve considerare anche l'ambiente generale: l'illuminazione e la ventilazione devono essere adeguate, la temperatura e l'umidità devono essere confortevoli, cosicché il personale possa lavorare in modo efficiente; alcuni strumenti possono essere danneggiati a causa di particolari temperature e di certi livelli di umidità, specialmente quelli che presentano delle componenti computerizzate.

2.3.2 Necessità procedurali e strumentali

Le procedure da eseguire sullo stesso campione nello stesso periodo di tempo dovrebbero essere svolte insieme in un'area della sezione. Tali raggruppamenti facilitano l'omogeneo andamento del lavoro e la stesura dei referti. Anche le procedure che richiedono l'utilizzo degli stessi strumenti devono essere raggruppate insieme, perciò il primo fattore che il supervisore dovrebbe considerare è rappresentato dalla eventualità di un raggruppamento.

Successivamente, per disporre in maniera efficiente dell'area di lavoro, è importante scegliere zone all'interno della sezione per diversi gruppi di procedure. La localizzazione degli strumenti dipende dalla disponibilità di

tutto ciò che serve per il loro funzionamento, per esempio la presenza di circuiti elettrici. Il supervisore dovrebbe valutare se sia più comodo per i laboratoristi stare seduti o in piedi quando lavorano ad uno strumento, e di conseguenza si dovrebbero apportare le modifiche.

Deve essere previsto uno spazio sufficiente sul piano di lavoro:

- per eseguire le operazioni procedurali necessarie
- per fornire un posto ai materiali e alle scorte indispensabili per la procedura.

Anche uno strumento fisso richiede dello spazio e deve essere messo vicino ad un banco o ad un'altra superficie di lavoro. Qualora i costituenti di uno strumento non vengano utilizzati durante l'esecuzione di una procedura, essi possono venire spostati.

2.3.3 Il fattore umano

Un razionale utilizzo dello spazio non può prescindere da considerazioni sulle attività umane che si svolgeranno nello spazio stesso.

Esiste un'area di lavoro normale ed una massima per le persone che svolgono un lavoro manuale.

L'area massima può essere determinata valutando la lunghezza delle braccia e tracciando un disegno circolare con le spalle come punti cardinali. Le aree sovrapposte formate dagli archi tracciati dalla mano destra e sinistra, costituiscono una zona oltre la quale le due mani non possono lavorare insieme da vicino senza muovere il corpo.

L'area di lavoro normale può venir determinata tracciando un arco in maniera simile. In questo caso, però, vengono estesi solo gli avrambracci, tenendo i gomiti vicino al corpo. L'area corrispondente rappresenta lo spazio in cui il lavoro che richiede l'uso di entrambe le mani può essere fatto nella maniera più conveniente; anche i movimenti degli occhi sono ridotti al minimo entro questa area.

2.3.4 La tecnica di disposizione spaziale

L'analisi delle aree di lavoro al fine di un uso più efficace dello spazio può venire facilitato disegnando delle piante in scala della sezione. Può venir usata della carta millimetrata per disegnare la stanza, con i banchi fissi inclusi nel disegno di base. Le localizzazioni di prese elettriche, di circuiti elettrici, di rubinetti di gas e dell'acqua, devono essere segnate, come pure l'altezza dei banchi con posto a sedere o senza. Dato che i banchi con posto a sedere normalmente presentano dei cassetti o dello spazio per gli scaffali al di sotto della superficie di lavoro, deve essere indicato lo spazio per le ginocchia. Tutte le attrezzature più importanti dovrebbero essere disegnate su un altro foglio di carta millimetrata, usando la medesima scala del disegno di base.

2.4 Le liste di lavoro giornaliero

Il modo in cui preparare una lista di lavoro è una delle prime cose da fare. Una lista di lavoro deve prevedere il massimo uso di risorse umane disponibili e allo stesso tempo deve essere giusta ed equa nei confronti dei dipendenti.

Il supervisore deve determinare quanti tecnici sono necessari ogni giorno, compreso il fine settimana; ciò richiede una conoscenza dei modelli di impostazione del lavoro e delle variazioni della sua quantità durante i diversi giorni settimanali. Le informazioni necessarie si possono ottenere riguardando le registrazioni del lavoro giornaliero durante un determinato periodo di tempo, bisogna esaminare anche i tipi di procedure eseguite durante i giorni della settimana e durante i fine settimana.

Si deve pure considerare la programmazione delle vacanze. Ovviamente, il supervisore non può permettere che i dipendenti prendano le vacanze nello stesso periodo; essi dovrebbero, inoltre, programmarle con sufficiente anticipo. Qualora troppi dipendenti scelgano lo stesso periodo, il supervisore deve decidere, in base ad un criterio di anzianità o di precedenza. Idealmente, il numero dei dipendenti dovrebbe essere sufficientemente

ampio da impedire un eccessivo carico di lavoro per quelli che rimangono quando qualcuno è in vacanza.

Una volta che il calendario è stato preparato, dovrà essere presentato e discusso con i dipendenti. È importante che essi capiscano le modalità di rotazione e la necessità di assegnare il lavoro di fine settimana. È importante accettare le richieste dei dipendenti, essere pronti ad apportare delle modifiche ma solo qualora ciò non comprometta il servizio prestato ai pazienti.

Il programma di lavoro deve essere stabilito per un periodo minimo di un mese e deve essere affisso nella bacheca per i comunicati della sezione. Modifiche nel programma non devono essere permesse senza che il supervisore ne venga a conoscenza e le approvi.

Nessun programma dovrebbe essere considerato imm modificabile; quando l'entità del lavoro aumenta e diminuisce, o intervengano modifiche nel tipo di servizi forniti, si renderà necessario riesaminare le esigenze di personale all'interno della sezione e decidere un nuovo programma di lavoro; questo si dovrebbe fare periodicamente; la flessibilità e la rispondenza alle necessità di eventuali modifiche sono elementi essenziali per la buona riuscita di tale programma.

2.5 Valutazione del carico di lavoro

La gestione efficiente di un laboratorio risulta impossibile senza che ci sia un sistema di misura del carico di lavoro. Tale valutazione permette al supervisore di stimare il livello ottimale di produttività, di determinare il numero di dipendenti necessari per fornire un adeguato servizio al paziente e di valutare il tasso di incremento in modo tale da prevedere le future necessità di personale.

Un accurato esame statistico del carico di lavoro fornisce varie informazioni; le cifre totali naturalmente misurano l'“output” di ciascun laboratorio e di ciascuna sezione tecnica. Risulta necessario esaminare questi dati statistici relativi a periodi annuali, mensili, settimanali o persino giornalieri per pianificare l'attività giornaliera della sezione o del laboratorio.

L'elemento base per valutare il carico di lavoro si fonda su valori espressi in termini unitari e sull'importanza assegnata a ciascuna procedura. Una unità equivale ad un minuto. Il valore totale in termini unitari per ogni procedura rappresenta il tempo speso in preparazione e svolgimento tecnico, in assistenza e in registrazioni d'ufficio necessario alla sua esecuzione.

I dati singoli vengono inseriti giornalmente nel modulo, per venire poi sommati a fine mese.

La somma dei test eseguiti sui campioni dei pazienti, degli standard, dei controlli di qualità, delle ripetizioni, rappresenta il totale complessivo. Questo, moltiplicato per il valore in termini unitari della procedura, equivale al carico di lavoro espresso in minuti. La somma di tutti i carichi di lavoro previsti all'interno della sezione equivale al valore del carico di lavoro totale.

Produttività

Il carico di lavoro totale messo in relazione al numero delle ore di lavoro umano rappresenta la misura standard della produttività:

$$Produttività = \frac{\text{carico di lavoro totale}}{\text{ore di lavoro umano}}$$

Possono essere previste due diverse modalità per la valutazione della produttività, entrambe sono funzionali. La prima si basa sulle ore lavorate, la seconda sulle ore pagate. Le ore pagate non comprendono soltanto le ore effettivamente lavorate, ma anche le ore di permesso, incluse le eventuali assenze, le malattie, le ferie e i permessi pagati. La produttività valutata in base alle ore lavorate corrisponde al tempo necessario per eseguire il lavoro, mentre la produttività valutata in base alle ore pagate corrisponde al carico finanziario totale gravante sul bilancio del laboratorio; ed è più bassa della produttività valutata in base alle ore effettivamente lavorate.

2.6 Organizzazione di un programma di sicurezza in un laboratorio clinico

Stabiliti i rischi dovranno essere messe a punto la strategia e le procedure di prevenzione e di controllo degli incidenti. Le procedure di sicurezza possono essere suddivise nelle seguenti categorie:

1. Sicurezza biologica
2. Sicurezza chimica
3. Sicurezza contro gli incendi

2.6.1 Sicurezza biologica

I rischi biologici o “biorischi” comprendono quegli agenti infettivi di rischio o di potenziale rischio per il benessere umano.

Parecchie misure possono eliminare o ridurre al minimo i contatti con materiali a rischio, queste comprendono:

- disinfezione delle aree di lavoro e dell’attrezzatura
- precauzioni da seguire in laboratorio
- conservazione ed eliminazione dei campioni e dei rifiuti biologici

Disinfezione delle aree di lavoro e dell’attrezzatura

I procedimenti e le analisi a cui sono sottoposti i campioni rivestono un alto grado di rischio per il personale di laboratorio. Tutto il materiale impiegato per le analisi di campioni biologici, compresa la vetreria, deve essere disinfettato e autoclavato per prevenire la diffusione di malattia.

Dovrà essere praticata, alla fine di ogni turno e, se necessario, anche più spesso, una decontaminazione delle superfici dei banchi di lavoro. Il disinfettante più economico ed efficace è l’ipoclorito di sodio (CloroxTM) diluito 1:100. La soluzione deve essere lasciata agire sulle superfici almeno 10 minuti per sfruttarne la massima efficacia. La bottiglia contenente

la soluzione dovrà avere una etichetta indicante “ipoclorito di sodio” e la data di preparazione. Nei casi in cui l’ipoclorito non è consigliabile, per esempio per l’acciaio inossidabile, si impiegherà una soluzione a base di fenolo al 3%.

Gli oggetti toccati continuamente, come i telefoni, i porta provette per gli strumenti automatici e le maniglie degli sportelli dei refrigeratori e dei cassetti, devono essere disinfettate settimanalmente e, se necessario, più spesso.

Precauzioni da seguire in laboratorio

La protezione del personale diminuisce notevolmente il rischio di infezione per gli addetti al laboratorio. Dovrà essere data una grande importanza ad un frequente lavaggio delle mani, alla necessità del divieto di fumare, di bere e alle norme che regolano i pasti, alla necessità di vestirsi con indumenti da laboratorio chiusi bottoni, all’obbligo di mettersi i guanti.

La tecnica indicata per lavarsi le mani è quella di usare acqua calda a temperatura giusta e un sapone per le mani, preferibilmente a base di fenolo. Ci si insapona sfregando una mano contro l’altra con speciale attenzione alle aree intorno alle unghie. Continuare ad insaponarsi per 1 minuto, risciacquare le mani con cura, asciugarsi. Una buona tecnica di lavaggio delle mani probabilmente non uccide gli agenti infettivi ma ha un effetto diluente.

I camici e le divise da laboratorio rappresentano una barriera protettiva contro la contaminazione della pelle e dei vestiti. Il camice deve essere sempre abbottonato e tolto ogni volta che si lascia il laboratorio per i pasti o alla fine della giornata. È obbligatorio un ricambio frequente dei camici usati. Non dovrà essere permesso di fumare, bere, mangiare, applicarsi lenti a contatto o cosmetici nel laboratorio o nell’area di trattamento dei campioni dei pazienti o di compilazione delle richieste e dei referti. Non dovranno essere conservati nell’area di analisi o nei refrigeratori per reagenti o materiali biologici, cibi, le bevande e le tazzine da caffè. Un re-

frigorifero apposito, collocato in un'area non contigua a quella di analisi, sarà predisposto a questo scopo.

Conservazione ed eliminazione dei campioni biologici e rifiuti

La maggior parte dei laboratori conservano i campioni per un breve periodo di tempo dopo l'analisi. I campioni devono essere ben protetti prima di immagazzinarli non solo per conservarli bene, ma cosa più importante, per impedire il possibile rischio derivante dal versamento e dalla produzione di vapori. Può essere usato del parafilm così come dei tappi puliti di gomma e di sughero per coprire i campioni.

Prima di eliminarli, i campioni biologici devono essere adeguatamente decontaminati e autoclavati. L'autoclave è il mezzo più accessibile e più facile da usare. Anche l'incenerimento può servire a questo scopo; tuttavia si deve ricordare che la vetreria, gli aghi e i vetrini non possono essere inceneriti. Questo materiale non si fonde ed è meglio eliminato con metodi manuali se prima è passato in autoclave.

In aggiunta ai campioni biologici, il materiale venuto a contatto con essi, come le bacchette applicatrici di legno, le pipette pasteur, le garze, le siringhe, i puntali delle pipette, deve esser scaricato separatamente da quello non contaminato. È obbligatorio che il personale addetto alle pulizie conosca la differenza tra i due tipi di rifiuti.

Tutto il materiale da passare in autoclave deve essere chiuso ermeticamente durante il trasporto all'autoclave stessa e nel maneggiarlo si devono indossare guanti per evitare il contatto con la cutte.

2.6.2 Sicurezza chimica

L'osservanza della sicurezza chimica comprende:

- corretta conservazione dei prodotti chimici
- corretto impiego
- un'eliminazione adeguata.

Conservazione delle sostanze chimiche

Le sostanze appartenenti ai seguenti gruppi generali devono essere raggruppate per prevenire possibili reazioni: infiammabili, tossiche, agenti ossidanti esplosivi, corrosivi, sostanze sensibili all'acqua, gas compressi.

La conservazione di sostanze nei magazzini deve essere ridotta al minimo, per avere un ricambio adeguato delle sostanze. Sono più vantaggiosi i recipienti piccoli, a meno che le quantità utilizzate e le date di scadenza non suggeriscano volumi più abbondanti. L'acquisto di piccoli volumi permette di avere una scorta più aggiornata delle sostanze ed elimina i rischi causati da sostanze avariate ed invecchiate. Su tutte le sostanze deve essere segnata la data di acquisto e di apertura del contenitore. Le sostanze vecchie, senza data o ad alto rischio di esplosioni e incendi devono essere eliminate.

Le sostanze incompatibili tra di loro devono essere conservate separatamente. Devono essere predisposte aree separate per gli acidi e le basi e conservate preferibilmente in armadietti verniciati con tinta anticorrosiva e privi di strutture a piombatura metallica.

Le sostanze infiammabili hanno un alto rischio di provocare incendi e devono essere immagazzinate appropriatamente in un armadietto di sicurezza antincendio il cui scopo è di proteggerli nei casi di scoppio di incendi in laboratorio. Essi sono in grado di resistere molto tempo prima di surriscaldarsi ed esplodere.

Precauzione d'uso delle sostanze chimiche

Il personale di laboratorio deve osservare le tecniche corrette e seguire rigorosamente i procedimenti quando lavora con sostanze corrosive. I camici da laboratorio, gli occhiali di sicurezza o le mascherine e i guanti proteggono e impediscono il contatto. In nessun momento si dovrà trattare una sostanza corrosiva senza la protezione per gli occhi.

Eliminazione di rifiuti chimici

I rifiuti chimici sono prodotti quotidianamente, e il loro scarico deve essere reso in ogni modo sicuro e soddisfacente. Le sostanze non inquinanti e mescolabili con acqua possono essere scaricate nel lavandino insieme ad acqua calda. Acidi e basi forti devono essere aggiunti a forti quantità di acqua prima di essere scaricati nel lavandino. Gli acidi devono essere sempre aggiunti all'acqua per evitare una reazione violenta.

Per quelle sostanze non mescolabili con l'acqua devono essere asportate e distrutte a cura di una ditta di scarico. Queste ditte raccoglieranno le sostanze chimiche e le elimineranno in uno scarico di profondità in terra.

2.6.3 Sicurezza anticendi

Un'efficace programma di sicurezza contro gli incendi nel laboratorio comprende misure preventive e di intervento. Le misure da seguire per prevenire gli incendi così come quelle da prendere quando sono scoppiati, saranno efficaci se altrettanto efficace è stato l'addestramento del personale di laboratorio organizzato dalla direzione.

Prevenzione degli incendi

La prevenzione degli incendi è sotto la diretta responsabilità di tutti coloro che lavorano nel laboratorio, ma il supervisore ha il dovere di fare rispettare le condizioni di sicurezza del lavoro e i programmi di addestramento. L'addestramento è fondamentale per assicurare una rapida e completa reazione in caso di incendio. Il personale deve essere a conoscenza dei rischi di incendio connessi al suo lavoro, alla conservazione e al controllo di materiali infiammabili, all'uso degli estintori e alle procedure da seguire nel corso di un incendio.

La conservazione di materiale infiammabile deve essere controllata e ridotta al minimo. Tutti i lavoratori di un laboratorio dovrebbero conoscere l'ubicazione degli estintori e saperli usare; obbligatorie sono le dimostrazioni d'uso e ad ogni impiego si deve dare la possibilità di provarli. Le

esercitazioni antincendio servono a diminuire la confusione e il panico durante un vero incendio. Tutto il personale deve conoscere come annunciare un incendio e come combatterlo e deve conoscere i piani di evacuazione.

Le uscite di sicurezza devono essere indicate chiaramente e evidenziate, sia per gli impiegati che per i visitatori. Essi sono di solito all'ingresso delle stanze e nei corridoi. Quando scoppia un incendio nel laboratorio, una reazione immediata salverà le vite e le attrezzature. L'allarme deve essere dato immediatamente, e ciò è più facilmente attuabile segnalando il numero telefonico per il soccorso antincendio in tutti i telefoni del laboratorio. Devono essere subito attivate anche le sirene di allarme. Se l'incendio è piccolo gli impiegati devono tentare di spegnerlo. Se è fuori da ogni tipo di controllo, il supervisore dovrà istruire il personale a evacuare le stanze, assicurandosi che tutti siano avvisati. Bisogna chiudere porte e finestre per evitare che altro ossigeno entri nelle stanze. Il supervisore o una persona incaricata dovrà rimanere a disposizione delle squadre interne antincendio o dei pompieri per informarli dell'ubicazione di materiali infiammabili e degli altri tipi di esplosivi, come eventuali bombole di gas.

Incendi ed estintori

Come illustra il triangolo della figura 2.3, un fuoco ha bisogno di tre elementi per accendersi e continuare a bruciare. Molte tecniche di prevenzione e di spegnimento comprendono l'eliminazione di uno di questi tre elementi: accensione, fuoco e ossigeno.

Il tipo di fuoco e di estintori da usare sono direttamente correlati.

Gli incendi di Classe A coinvolgono materiale combustibile ordinario come legno, abiti, carta.

Quelli di Classe B liquidi infiammabili, come i solventi, oli lubrificanti, benzina e grasso.

Quelli di Classe C, attrezzature elettriche mentre gli incendi di Classe D coinvolgono i metalli combustibili come magnesio, sodio, litio e titanio.

Gli estintori per ognuno di queste classi sono classificati in questo modo:

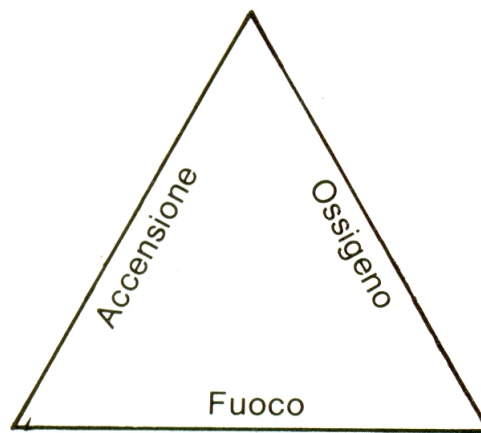


Figura 2.3: I tre elementi necessari per un incendio

Estintori per incendi di Classe A: ad acqua, per raffreddare il fuoco.

Estintori per incendi di Class B: si possono usare anidride carbonica e sostanze chimiche secche o solide.

Estintori per incendi di Classe C: da usare agenti non conducenti, come schiuma di sostanze secche o anidride carbonica.

Estintori per incendi di Classe D: sono degli estintori speciali. Un materiale molto usato per spegnere incendi di questo tipo è la sabbia.

I tipi di estintori che si acquistano per il laboratorio clinico dipendono dal tipo di rischi esistenti. Generalmente, gli incendi più frequenti sono provocati da problemi elettrici o da sostanze infiammabili. Rarissimamente l'incendio sarà dovuto alla carta e così un estintore di tipo A non riveste grande utilità in quanto di solito contiene acqua. Aggiungere dell'acqua ad un incendio da cause elettriche aumenta soltanto i rischi con la possibilità di folgorazioni vere e proprie. Inoltre, aggiungere acqua a un incendio causato da liquidi infiammabili può provocare un ulteriore spandimento del liquido.

Gli estintori a base di sostanze secche o anidride carbonica sono quelli più comuni in laboratorio perché possono essere usati in incendi da

cause elettriche e in quelli provocati da liquidi infiammabili, carta e altri combustibili.

Il peso e la pressione degli estintori devono essere controllati ogni anno. Questo intervento di sicurezza è effettuato a cura della sezione di manutenzione o da quella tecnica. Gli estintori usati devono essere sostituiti fino a che non siano ricaricati.

Essi vanno collocati in ubicazioni evidenti in modo che il personale e i visitatori li possano notare entrando nelle sotanze.

Alcune cose da fare e da non fare sono:

1. Innescare l'interruttore per l'allarme più vicino.
2. Chiamare il numero indicato per gli interventi antincendio.
3. Se l'incendio è piccolo, tentare di bloccarlo con l'estintore adatto.
4. Se fosse necessario evacuare, andare in ordine verso l'uscita più prossima.
5. Chiudere le porte e le finestre prima di abbandonare l'area.
6. Se si sono incendiati gli abiti, gettarsi a terra e strisciare o rotolare, preferibilmente dentro una coperta ignifuga.
7. Se si è circondati dal fuoco, strisciare verso l'uscita. Il fumo si alza e a livello del terreno è più facile respirare. È anche utile farlo attraverso un fazzoletto o un tovagliolo umido.
8. Non usare gli ascensori durante l'evacuazione. L'elettricità può staccarsi e si rischia di rimanere intrappolati all'interno o di aprire le porte ai piani incendiati.
9. Non bloccare le entrate e non rientrate nell'edificio.
10. Non farsi cogliere dal panico.
11. Non correre.

2.6.4 Sicurezza elettrica

I malfunzionamenti elettrici degli strumenti e dell'attrezzatura impiegati in laboratorio possono provocare incendi e/o scosse elettriche anche mortali per il personale.

Tutta l'attrezzatura elettrica deve essere sottoposta a ispezioni periodiche (ogni 6 mesi od ogni anno) in cui controllare che le messe a terra siano corrette e che non ci siano eventuali fughe di corrente. Vanno controllati tutti i fili elettrici per eventuali estremità logorate, spine rotte, fili esposti e per la presenza delle messe a terra di sicurezza che servono a indirizzare gli eccessi di corrente verso il terreno piuttosto che verso l'operatore.

L'attrezzatura deve sempre essere staccata dalla rete prima di svolgere interventi di manutenzione. Gli strumenti in cui si è sparso del liquido e che sono ancora attaccati alla rete elettrica devono essere immediatamente staccati e fatti asciugare. Le procedure di sicurezza devono venire scritte e indicate tutte le precauzioni.

Se capita un incidente in seguito ad una scossa elettrica, le indicazioni di intervento devono essere:

1. Staccare la corrente o rimuovere attentamente i contatti dalla vittima con un isolante (che non conduca elettricità). Utilizzare un pipetta di vetro, della gomma pesante o dei guanti di asbesto o semplicemente una mano dentro un becher per spingere da parte la vittima o i contatti. Non tentare di toccare la vittima ancora in contatto con la corrente. Se ciò accadesse il soccorritore diverrebbe anch'esso parte del circuito e rischierebbe di essere fulminato.
2. Controllata la fonte di corrente, dovrà essere chiamato un soccorso medico e praticate manovre di rianimazione cardiopolmonari.
3. Non dovrà essere tentato di muovere il malcapitato nell'attesa dell'arrivo dell'assistenza medica. Riscaldare la vittima. A questo scopo potrebbe essere utile una coperta ignifuga.

Capitolo 3

MATERIALI E METODI

3.1 Esame batteriologico

3.1.1 Raccolta dei campioni

Dato che i campioni biologici sono raccolti da tutta una serie di operatori del settore sanitario, è fondamentale inoltre che il microbiologo clinico stabilisca dei criteri di rifiuto, o poiché il campione è stato preso in maniera non corretta o per il fatto che il test richiesto non è quello giusto per il campione affidato al microbiologo. In tali casi è importante che il microbiologo e il clinico comunichino fra di loro, non solo al fine di garantire che venga consegnato un altro campione, ma anche per istruire al medico su quale sia il campione più opportuno.

Una volta che il laboratorio lo ha ricevuto, il microbiologo deve avere stabilito delle linee guida per il trattamento dei campioni tese a garantire che siano effettuati i test corretti. Chi lavora in laboratorio deve essere in grado di distinguere tra flora indigena e potenziali patogeni, considerata l'ovvia tendenza dei medici a dare significato clinico a tutto ciò che il laboratorio ha riportato.

3.1.2 Il campione biologico

Il campione biologico deve provenire dall'effettivo sito di infezione, e deve essere raccolto contaminandolo il meno possibile con tessuti, organi o secrezioni adiacenti. Per la raccolta dei campioni, si devono impiegare dei contenitori sterili; è altresì importante che questi ultimi siano costruiti in modo da agevolare il prelievo, in particolare se ai pazienti è richiesto di raccogliere i propri campioni.

3.1.3 Terreni di coltura

I batteri possono essere suddivisi in due grossi gruppi sulla base delle loro richieste di carbonio:

1. **Batteri autotrofi:** possono utilizzare l'anidride carbonica come unica fonte di carbonio e sintetizzare a partire da questa gli scheletri

carboniosi per tutti i loro metaboliti organici; essi richiedono solo acqua, sali inorganici e CO₂ per la crescita e ricavano l'energia:

- dalla luce (batteri fotoautotrofi) o dall'ossidazione di una o più sostanze inorganiche (batteri chemioautotrofi).

2. **Batteri eterotrofi:** utilizzano composti organici come fonte di carbonio e ricavano l'energia:

- dalla luce (batteri fotoeterotrofi) o dall'ossidazione di una o più sostanze organiche (batteri chemioeterotrofi).

I batteri di interesse medico sono chemioeterotrofi, utilizzano, cioè, composti organici sia come fonte di carbonio che come fonte di energia.

I terreni di coltura per i batteri, tutti costituiti da materiali inerti, possono essere suddivisi in base:

- Allo stato fisico:
 - terreni liquidi
 - terreni solidi.
- Alla costituzione chimica:
 - terreni minimi
 - terreni sintetici (o semplici)
 - terreni complessi
 - terreni semisintetici.
- Alla funzione:
 - terreni di arricchimento
 - terreni selettivi
 - terreni differenziali.

Terreni minimi

In questi terreni sono aggiunti elementi essenziali (N, C, S, P) come sali inorganici in concentrazione nota. In questi terreni possono moltiplicarsi solo i batteri chemioautotrofi.

Terreni sintetici (o semplici)

Sono costituiti oltre che da acqua, da composti organici ed inorganici addizionati in concentrazioni note, quali fonti sia di C, N, S, P che di aminoacidi, basi azotate e vitamine, indispensabili per la sintesi di proteine, acidi nucleici e necessari come catalizzatori di reazioni metaboliche.

Terreni complessi

Terreni ricchi di substrati organici, non tutti a composizione nota (estratto di carne, di organo, di lievito, di embrione, siero di sangue, liquido ascitico). Questi terreni sono utili per la coltivazione di batteri particolarmente esigenti dal punto di vista nutrizionale. Infatti mentre tutti i contaminanti ambientali crescono bene nel brodo o nell'agar nutritivo, la maggior parte dei batteri di interesse medico richiede terreni più ricchi, per cui, a seconda delle esigenze, i terreni standard vengono addizionati di glucosio, estratto di lievito, sangue, vitamine ed altri fattori di crescita.

Terreni semisintetici

Sono i terreni più utilizzati, contengono sia elementi propri dei terreni semplici che componenti dei terreni complessi.

Terreni di arricchimento

Sono terreni complessi, liquidi, che favoriscono una rapida crescita del microrganismo di interesse, la cui replicazione, diversamente, verrebbe ostacolata dalla moltiplicazione di altri microrganismi presenti nel campione da esame.

Terreni selettivi

Sono terreni solidi che permettono la moltiplicazione preferenziale di alcune specie patogene attraverso l'azione selettiva di sostanze tossiche, inattive sulla specie che si intende isolare ma capaci di inibire la crescita delle altre specie contaminanti.

Terreni differenziali

Sono terreni contenenti particolari indicatori che consentono di distinguere tra loro specie batteriche differenti, sfruttando caratteristiche macroscopiche delle colonie.

3.1.4 Metodi di semina

Dopo che un campione ha superato i vari criteri per un eventuale rifiuto ed è stato accettato per la coltura, la semina di tutti i campioni nei terreni di coltura dovrebbe essere condotta in una cappa biologia di sicurezza a flusso laminare e manipolare ogni campione come se fosse altamente infettivo.

Ci sono due metodi per seminare un campione biologico:

- Semina ad isolamento
- Semina a reticolo

3.1.5 Semina ad isolamento

Si può inoculare con il campione la superficie dei terreni di coltura contenuti nelle piastre di Petri in vari modi, uno dei quali è mostrato nella figura 3.1. L'inoculazione primaria può essere effettuata con un'ansa, un tampone o un altro utensile adatto, dopo di che si può utilizzare un'ansa per spargere il materiale nei quattro quadranti della piastra, come esposto in figura 3.2; in seguito l'inoculo viene strisciato con un movimento alternato in ciascun quadrante, facendo ruotare la piastra di 90 gradi.

Lo scopo di una semina ad isolamento consiste nel diluire l'inoculo sulla superficie del terreno di coltura contenuto nella piastra di Petri in

misura sufficiente da ottenere colonie ben isolate di batteri, note con il nome di unità formanti colonie (CFU, *colony-forming unit*); le colonie isolate possono poi essere sottocoltivate singolarmente in altri terreni al fine di ottenere delle popolazioni pure da usare per indagini successive.

3.1.6 Semina di un tampone

L'inoculo iniziale deve ricoprire una superficie compresa tra un terzo ed un quarto dell'area complessiva dell'agar utilizzato. Il tampone deve essere ruotato sopra l'area di inoculo per ottimizzare il trasferimento dei microrganismi. Dopo di che spargere l'inoculo iniziale del campione con l'ansa da 10 μ l, facendo una semina ad isolamento (vedi paragrafo 3.1.5).

3.1.7 Semina a reticolo

La tecnica di strisciatura usata per inoculare i terreni di agar ai fini di una conta semiquantitativa delle colonie è illustrata in figura 3.3. L'ansa monouso in plastica da 1 μ l viene immersa in un campione di urina non centrifugato; poi l'ansa viene appoggiata sulla superficie di una piastra agar e strisciata attraverso per l'intero diametro. L'inoculo viene distribuito in maniera uniforme ad angolo retto rispetto alla strisciata primaria; quindi la piastra è fatta ruotare di 90 gradi e l'inoculo sparso in modo da coprire tutta la superficie.

Dopo 18–24 ore di incubazione si stima il numero dei batteri nei campioni di urina contando quello delle colonie presenti sulla superficie dell'agar.

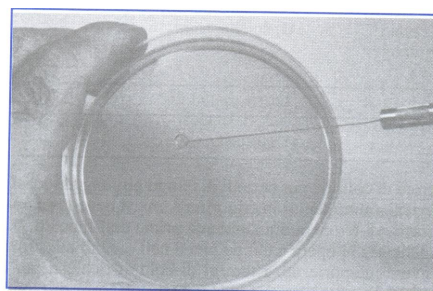


Figura 3.1: Superficie di una piastra di agar inoculata con un campione contenuto in un'ansa per inoculazione, che si effettua toccando, come prima operazione, la superficie dell'agar in corrispondenza di una piccola zona, quindi strisciandola con un movimento alternato secondo un andamento come quello mostrato in figura 3.2

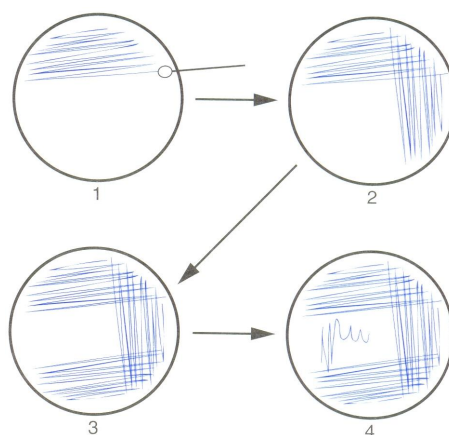


Figura 3.2: Strisciatura per l'inoculazione di campioni su piastre per cultura allo scopo di ottenere colonie batteriche isolate

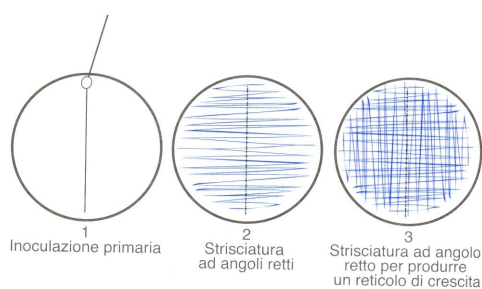


Figura 3.3: Piastre per cultura che illustrano l'esecuzione della strisciatura di campioni per i quali si deve condurre una conta batterica semiquantitativa

3.1.8 Semina dei campioni

Bile: viene seminata in due modi:

- semina diretta
- semina indiretta

Semina diretta

Vengono seminati a reticolo (vedi paragrafo 3.1.7) con un'ansa da 10 μ l su due terreni solidi:

- Agar cioccolato
- Sabouraud

Semina indiretta

Vengono aggiunti 5 ml di brodo “Brain heart infusion” in ogni campione della bile rimanente dalla semina a reticolo, e poi vengono incubati a 37 °C per 24 ore. Se la coltura della semina diretta dopo 24 ore di incubazione a 37 °C fosse negativa, i campioni in brodo “Brain heart infusion” vengono seminati ad isolamento (vedi paragrafo 3.1.5) su Agar cioccolato.

Broncoaspirato: vengono seminati ad isolamento con un'ansa da 10 μ l su quattro terreni solidi ed a reticolo su Agar cioccolato:

- Agar sangue in CO₂
- MacConkey
- Sale mannite
- Sabouraud.
- Agar cioccolato¹

¹Dopo la diluizione degli stessi campioni in api Suspension Medium (due ansate da 10 μ l del campione in 2 ml di api Suspension Medium; 1:100) vengono seminati a reticolo su Agar cioccolato.

Broncolavaggio: vengono seminati ad isolamento con un'ansa da 10 μ l su quattro terreni solidi ed a reticolo su Agar cioccolato:

- Agar sangue in CO₂
- MacConkey
- Sale mannite
- Sabouraud.
- Agar cioccolato²

Catetere venoso centrale: vengono diluiti in 5 ml di brodo “BBL Brain heart infusion” e poi seminati ad isolamento con un'ansa da 10 μ l su Agar sangue e a reticolo su Sabouraud.

Catetere vescicale: vengono diluiti in 5 ml di brodo “BBL brain heart infusion” e poi seminati ad isolamento con un'ansa da 10 μ l su quattro terreni solidi:

- Agar sangue
- MacConkey
- Sale mannite
- Sabouraud.

Drenaggio: vengono seminati a reticolo con un'ansa da 10 μ l su Agar cioccolato.

Espettorato: vengono seminati ad isolamento con un'ansa da 10 μ l su cinque terreni solidi:

- Agar cioccolato³

²Dopo la diluizione degli stessi campioni in api Suspension Medium (due ansate da 10 μ l del campione in 2 ml di api Suspension Medium; 1:100) vengono seminati a reticolo su Agar cioccolato.

³I campioni devono essere chiaramente specificati nella richiesta per la carica batterica: seminare a reticolo su Agar cioccolato dopo la diluizione in api Suspension Medium (due ansate del campione da 10 μ l in 2 ml di api Suspension Medium; 1:100).

- Agar sangue
- MacConkey
- Sale mannite
- Sabouraud.

Feci: i campioni vengono seminati ad isolamento su due terreni:

- Sabouraud
- MacConkey⁴

Gli stessi campioni vengono diluiti in brodo Selenite F (un'ansata del campione nel brodo Selenite F) e dopo 24 ore di incubazione a 37 °C vengono seminati su terreno SS (Salmonella e Shigella).

Sperma: vengono seminati ad isolamento con un'ansa da 10 µl su quattro terreni solidi:

- Agar sangue in CO₂,
- MacConkey
- Sale Mannite
- Sabouraud.

E seminati a reticolo solamente su Agar cioccolato.

Tampone anale: vengono seminati ad isolamento su tre terreni solidi (vedi paragrafo 3.1.6):

- MacConkey
- Sale Mannite
- Sabouraud

Tampone ascellare: vengono seminati su quattro terreni solidi (vedi paragrafo 3.1.6):

⁴Su terreno MacConkey vengono seminati solo i campioni dei pazienti di età pediatrica o dei paziente ricoverati nei reparti di rianimazione.

- Agar sangue
- MacConkey
- Sale Mannite
- Sabouraud.

Tampone auricolare: vengono seminati su quattro terreni solidi (vedi paragrafo 3.1.6):

- Agar sangue
- MacConkey
- Sale Mannite
- Sabouraud.

Tampone catetere CVC: vengono seminati su quattro terreni solidi (vedi paragrafo 3.1.6):

- Agar sangue
- MacConkey
- Sale Mannite
- Sabouraud.

Tampone cutaneo: vengono seminati su quattro terreni solidi (vedi paragrafo 3.1.6):

- Agar sangue
- MacConkey
- Sale Mannite
- Sabouraud.

Tampone faringeo: vengono seminati su quattro terreni solidi (vedi paragrafo 3.1.6):

- Agar sangue

- MacConkey
- Sale Mannite
- Sabouraud.

Tampone ferita: vengono seminati su sei terreni solidi (vedi paragrafo 3.1.6):

- Agar sangue
- Agar sangue in CO₂
- Agar Schaedler in anaerobiosi (ANA)
- MacConkey
- Sale Mannite
- Sabouraud.

Tampone inguinale: vengono seminati su quattro terreni solidi (vedi paragrafo 3.1.6):

- Agar sangue
- MacConkey
- Sale Mannite
- Sabouraud.

Tampone nasale: vengono seminati su tre terreni solidi (vedi paragrafo 3.1.6):

- Agar sangue
- Sale Mannite
- Sabouraud.

Tampone oculare: vengono seminati su cinque terreni solidi (vedi paragrafo 3.1.6):

- Agar sangue

- Agar sangue in CO₂
- MacConkey
- Sale Mannite
- Sabouraud.

Tampone uretrale: vengono seminati su cinque terreni solidi (vedi paragrafo 3.1.6):

- Agar cioccolato
- Agar sangue in CO₂
- MacConkey
- Sale Mannite
- Sabouraud

Tampone vaginale: vengono seminati su quattro terreni solidi (vedi paragrafo 3.1.6):

- Agar sangue
- MacConkey
- Sale Mannite
- Sabouraud.

Urine: 443 vengono seminati a reticolo con un'ansa da 1 µl su due terreni solidi (vedi paragrafo 3.1.7):

- Agar sangue
- MacConkey.

Emocoltura: viene incubata nello strumento BD BACTE FX (vedi paragrafo 3.1.30) per un periodo massimo di 15 giorni a 35 ± 1,5 °C.

Emocoltura positiva

Le emocolture positive vengono seminate ad isolamento con un'ansa da 10 μ l in due colture: aerobia ed anaerobia.

Coltura aerobia:

- Agar cioccolato
- Agar sangue
- MacConkey
- Sale Mannite
- Sabouraud.

Coltura anaerobia:

- Agar cioccolato
- Agar sangue
- MacConkey
- Sale Mannite
- Agar schaedler.

Inoltre, sulle emocolture positive, vengono condotte una colorazione di Gram (vedi paragrafo 3.1.9) e quelle che risultano positive ai batteri gram-negativi, vengono identificate immediatamente⁵ e fatte l'antibiogramma con i sistemi VITEK 2 (bioMérieux; vedi paragrafo 3.1.32).

Coltura del liquido pleurico: le colture del liquido pleurico vengono incubate nello strumento Bacter/ALERT 3D (vedi paragrafo 3.1.30) per un periodo massimo di 7 giorni a $35 \pm 1,5$ °C.

Liquido pleurico positivo

I campioni positivi, vengono seminati ad isolamento con un'ansa da 10 μ l in due colture: aerobia ed anaerobia.

⁵Una batteremia o settisemia da batteri gram-negativi è più pericolosa di quella da batteri gram-positivi.

Coltura aerobia:

- Agar sangue
- MacConkey
- Sale Mannite
- Sabouraud.

Coltura anaerobia:

- Agar sangue
- MacConkey
- Sale Mannite
- Agar schaedler.

3.1.9 Colorazione di Gram

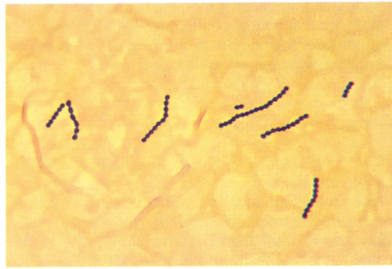
Questa colorazione, scoperta poco più di un secolo fa da Hans Christian Gram, è usata per lo più ai fini dell'esame microscopico diretto di campioni e sottocolture. Il cristal violetto (violetto di genziana) funge da colorante primario, legandosi alla parete cellulare dei batteri in seguito a trattamento con una soluzione debole di iodio, che svolge la funzione di mordente per legare il colorante. Determinate specie batteriche, in ragione della natura chimica della loro parete, sono in grado di trattenere il cristal violetto anche in seguito a trattamento con un decolorante organico, come ad esempio una miscela di parti uguali di acetone e alcool etilico al 95%; quando sono osservati al microscopio, i batteri che trattengono il colorante sono di aspetto blu-viola e sono denominati gram-positivi. Se li si tratta con la sostanza decolorante, taluni batteri perdono la colorazione primaria con il cristal violetto, verosimilmente a causa dell'elevato contenuto in lipidi della parete cellulare e a causa dello stato di peptidoglicano, molto più sottile che nei gram-positivi; questi microrganismi decolorati captano poi la controcolorazione con safranina, sono di colore rosso quando li si osserva al microscopio e sono definiti batteri gram-negativi.

Procedura della colorazione di Gram

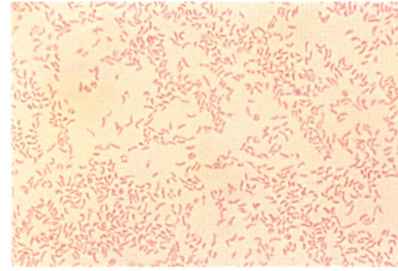
1. Preparare un sottile striscio del materiale da studiare e lasciare asciugare all'aria.
2. Fissare il materiale al vetrino facendo passare tre o quattro volte quest'ultimo sulla fiamma di un bruciatore Bunsen per evitare che il materiale venga rimosso durante la procedura di colorazione e per uccidere i batteri.
3. Posizionare lo striscio su un supporto per colorazione e ricoprire la superficie con soluzione di cristal violetto.
4. Dopo 1 minuto di esposizione al cristal violetto, lavare bene con acqua corrente.
5. Ricoprire lo striscio con soluzione iodata di Gram per 1 minuto; lavare di nuovo con acqua.
6. Ricoprire la superficie con alcune gocce del decolorante acetone-alcool per 10 secondi.
7. Lavare con acqua corrente e riporre lo striscio sul supporto usato per colorare; ricoprire la superficie con il controcolorante safranina per 1 minuto, poi lavare con acqua corrente.
8. Disporre lo striscio in posizione verticale sul supporto per colorazione, eliminando così l'acqua in eccesso e consentendo allo striscio di asciugare.
9. Esaminare lo striscio colorato con l'obiettivo del microscopio 100× in immersione (olio).

Interpretazione dei risultati

I batteri gram-positivi si colorano in viola (fig. 3.4(a)), mentre quelli gram-negativi assumono un aspetto tra il rosa e il rosso (fig. 3.4(b)).



(a) *Streptococcus pyogenes* (cocchi gram-positivi)



(b) *Vibrio* spp. (bacilli gram-negativi)

Figura 3.4: Colorazione di Gram

3.1.10 Esame a fresco con blu di metilene

È una colorazione non selettiva e di impiego generale, utilizzata per distinguere i batteri dai lieviti. Evidenzia la forma delle cellule nel preparato, senza distinguere altre strutture. I corpi cellulari appaiono di colore blu, quelli dei batteri sono di dimensioni molto più piccoli dei lieviti.

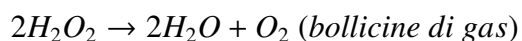
Procedimento

1. Utilizzando un'ansa da inoculo, trasferire del materiale raccolto dal centro di una colonia sulla superficie di un vetrino portaoggetto.
2. Aggiungere una goccia di blu di metilene e miscelare.
3. Coprire il vetrino con il vetrino coprioggetto, evitando la formazione di bolle d'aria.
4. Osservare al microscopio ottico con obiettivo 40×. I batteri appaiono come puntini di colore blu, molto più piccoli dei lieviti.

3.1.11 Test della catalasi

Il perossido di idrogeno è uno dei prodotti di ossidazione finale del metabolismo aerobico dei carboidrati. Il suo accumulo è letale per le cel-

lule batteriche. La catalasi converte il perossido di idrogeno in ossigeno e acqua:



Il test della catalasi è utilizzato comunemente per differenziare i membri del gruppo delle *Micrococcaceae* da quelli del gruppo delle *Streptococcaceae*.

Procedura del test

1. Utilizzando un'ansa da inoculo, trasferire del materiale raccolto dal centro di una colonia sulla superficie di un vetrino portaoggetto.
2. Aggiungere una goccia di perossido di idrogeno al 3% e osservare la formazione di bollicine.

Interpretazione dei risultati

La comparsa rapida e prolungata di bollicine o di effervescenza è indicativa della positività del test. Poiché alcuni batteri hanno enzimi diversi dalla catalasi che sono capaci di scindere il perossido di idrogeno, la formazione di poche bollicine minuscole dopo 20–30 secondi non è considerata come risultato positivo del test. Inoltre, la catalasi è presente negli eritrociti, quindi si deve fare attenzione ad evitare di trasportare globuli rossi dell'agar sangue con il materiale della colonia.

3.1.12 Test della coagulasi

La coagulasi stafilococcica è una proteina di composizione chimica sconosciuta, che possiede un'attività simile a quella protrombinica, essendo in grado di convertire il fibrinogeno a fibrina, e di formare un coagulo ben visibile.

In laboratorio, il test della coagulasi viene utilizzato per identificare *Staphylococcus aureus* e per differenziarlo dalla maggioranza delle altre specie di stafilococchi, che non producono coagulasi.

Procedura del test

1. Test su vetrino (coagulasi legata):

- Mettere due gocce di acqua sterile o di soluzione salina in due cerchi disegnati su un vetrino portaoggetti con una matita.
- Emulsionare delicatamente il materiale proveniente dalle colonie del microrganismo da identificare nel liquido contenuto all'interno di ciascun cerchio.
- Mettere una goccia di plasma per la coagulasi nella sospensione contenuta in uno dei cerchi e miscelare con un bastoncino applicatore di legno.
- Mettere un'altra goccia di acqua o di soluzione salina nell'altro cerchio come controllo.
- Muovere il vetrino avanti e indietro, cercando di osservare l'agglutinazione della sospensione in esame.

2. Test in provetta (coagulasi libera):

- Emulsionare una piccola quantità del materiale proveniente dalla colonia del microrganismo in una provetta contenente 0,5 ml di plasma per coagulasi.
- Incubare la provetta a 37 °C per 4 ore e osservare la formazione del coagulo inclinando delicatamente la provetta. Se non si osserva alcun coagulo, reincubare la provetta a temperatura ambiente ed esaminarla di nuovo dopo 18 ore.

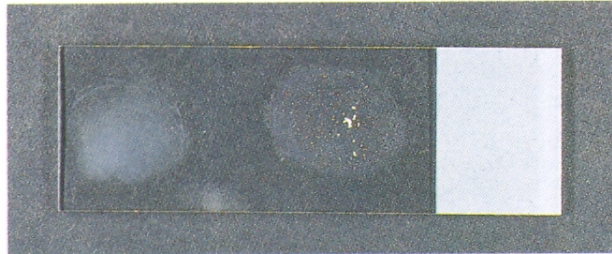
3. agglutinazione del lattice:

- la tecnica prevede l'uso di particelle di lattice legate al plasma. Il fibrinogeno adeso al lattice rivela la presenza del clumping factor, mentre le immunoglobuline legate sulla superficie delle particelle stesse rivelano la presenza della proteina A, proteina della parete cellulare stafilococcica che si lega al recettore

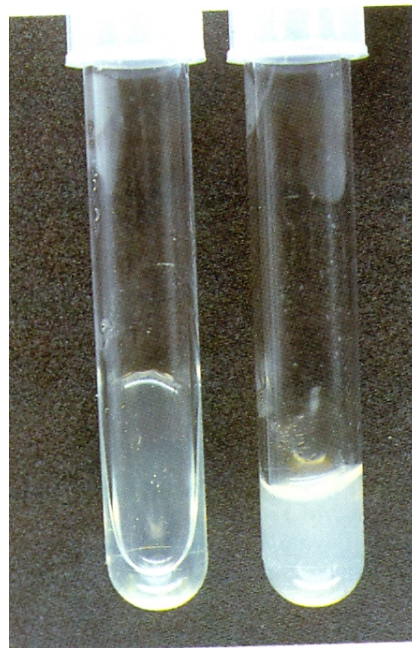
Fc delle immunoglobuline G. Mettendo a contatto una sospensione batterica ed una di particelle di lattice, si produce una rapida agglutinazione (fig. 3.5(c)).

Interpretazione dei risultati

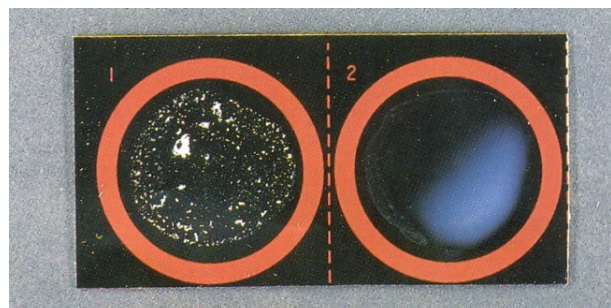
1. Test su vetrino: una reazione positiva sarà rilevata entro 10–15 secondi dalla miscelazione del plasma con la sospensione, sotto forma di un precipitato bianco (fig. 3.5(a)) che indica l'agglutinazione dei microrganismi in sospensione. Il test viene considerato negativo se non si osserva alcuna agglutinazione dopo 2 minuti. La soluzione salina di controllo deve rimanere omogenea e lattiginosa. Il test non è interpretabile se anche la soluzione di controllo mostra agglutinazione. Tutti i ceppi che sono coagulasi-positivi possono essere riportati come *Staphylococcus* coagulasi-positivo oppure, meno precisamente, come *Staphylococcus aureus*.
2. Test in provetta: il test della coagulasi in provetta viene considerato positivo se viene notato un qualunque tipo di coagulo (fig. 3.5(b)). La provetta deve essere inclinata delicatamente e non deve essere agitata, poiché ciò potrebbe danneggiare il coagulo parzialmente formato.
3. Agglutinazione del lattice: Mettendo a contatto una sospensione batterica ed una di particelle di lattice, si produce una rapida agglutinazione (fig. 3.5(c)), come indice di positività del test.



(a) Coagulasi su vetrino



(b) Coagulasi in provetta



(c) Agglutinazione del lattice

Figura 3.5: Test della coagulasi

3.1.13 Test di solubilità nella bile

I sali biliari, e in particolare il desossicolato di sodio e il taurocolato di sodio, hanno la capacità di lisare in modo selettivo lo *Streptococcus pneumoniae* quando sono aggiunti a batteri in attiva crescita in terreni con agar o in brodi.

Il test di solubilità nella bile può essere eseguito su una coltura liquida del microrganismo oppure sulle colonie cresciute su terreni contenenti agar.

Procedura del test

1. Test in brodo

- Trasferire in due provette pulite circa 0,5 ml di una brodocoltura di 18–24 ore. Alternativamente si può preparare una sospensione del microrganismo in soluzione salina tamponata con fosfato, a pH 7,0, a partire dal materiale cresciuto su terreno con agar. In quest'ultimo caso non è necessario modificare il pH.
- Aggiungere a ogni provetta una goccia dell'indicatore rosso fenolo.
- Aggiungere idrossido di sodio 0,10 N per portare il pH a 7,0 (indicato da un colore rosa chiaro).
- Aggiungere 0,5 ml di desossicolato di sodio al 10% ad una delle provette (marcata "test").
- Aggiungere 0,5 ml di una normale soluzione salina sterile all'altra provetta (marcata "controllo").
- Agitare delicatamente entrambe le provette e metterle in un incubatore o in un bagnetto ad acqua a 37 °C per 3 ore, controllando ogni ora.

2. Test su piastra

- Mettere una goccia di desossicolato di sodio al 2% su alcune colonie ben isolate del microrganismo in esame, coltivate su agar contenente sangue di pecora.
- Mettere la piastra in incubatore a 37 °C per 30 minuti, senza capovolgerla.

Interpretazioi dei risultati

1. Test in brodo

Solubile nella bile (reazione positiva): si verifica una visibile chiari-ficazione della sospensione nella provetta che contiene il desossico-lato di sodio, mentre non vi è alcun cambiamento nell'aspetto della sospensione nel caso della soluzione salina di controllo.

Insolubile nella bile (reazione negativa): non si verifica alcun cam-biamento di torbità nella provetta contenente il desossicolato di sodio rispetto alla soluzione salina di controllo.

2. Test su piastra

Solubile nella bile (reazione positiva): le colonie su cui è stato messo il reagente scompaiono, lasciando un'area parzialmente emolizzata in corrispondenza della colonia (fig. 3.6).

Insolubile nella bile (reazione negativa): le colonie su cui è stato messo il reagente rimangono intatte e visibili.

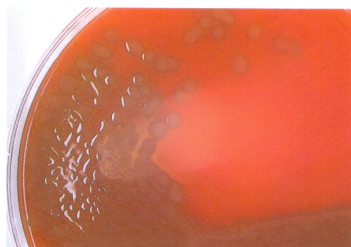


Figura 3.6: Test di solubilità nella bile per l'identificazione di *Streptococcus pneumoniae* su agar sangue

3.1.14 Test dell'indolo

L'indolo, un benzilpirrolo, è uno dei prodotti metabolici di degradazione dell'amminoacido triptofano. I batteri che possiedono l'enzima triptofanasi sono capaci di idrolizzare e deaminare il triptofano, con produzione di indolo, acido piruvico e ammoniaca. La produzione di indolo è una caratteristica importante nell'identificazione di molte specie di microrganismi, ed è utile in particolare per distinguere *Escherischia coli* (positiva) dai membri del gruppo *Klebsiella-Enterobacter-Hafnia-Serratia* (prevalentemente negativi).

Procedura del test

Inoculare il brodo al triptofano (o altri terreni all'indolo adatti) con il microrganismo in esame e incubare a 37 °C per 18–24 ore. Al termine di questo periodo di incubazione, aggiungere 15 gocce di reagente facendolo scorrere lungo la parete interna della provetta. Se viene utilizzato il reagente di Ehrlich, questa tappa deve essere preceduta dall'aggiunta di 1 ml di xilene. Ciò non è necessario con il reagente di Kovac.

Interpretazione dei risultati

Lo sviluppo di un colore rosso fucsia intenso all'interfaccia tra il reagente e il brodo (o lo strato di xilene), nel giro di secondi dall'aggiunta del reagente, è indicativo della presenza di indolo e rappresenta un test positivo.

3.1.15 Test della citocromo ossidasi

I citocromi sono emoproteine contenenti ferro e costituiscono l'ultimo anello della catena della respirazione aerobica trasferendo elettroni (idrogeno) all'ossigeno, con formazione di acqua. Il sistema dei citocromi si trova negli organismi aerobi, microaerofili e negli anaerobi facoltativi, cosicché il test dell'ossidasi è importante nell'identificazione di microrganismi che sono privi dell'enzima o sono anaerobi obbligati. Il test è molto

utile nell'esame preliminare di colonie sospette di appartenere alle *Enterobacteriaceae* (tutte negative) e nell'identificazione di colonie sospette di appartenere ad altre specie quali *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Neisseria*, *Campylobacter* e *Pasteurella* (positivi).

Procedura del test

Il test è eseguito comunemente mediante uno dei due seguenti metodi:

- la tecnica diretta su piastra, in cui due o tre gocce di reagente vengono aggiunte direttamente alle colonie batteriche isolate che sono cresciute sul terreno della piastra
- la tecnica indiretta su striscia di carta, in cui alcune gocce di reagente vengono aggiunte a una striscia di carta di filtro oppure si utilizzano dei dischetti o delle strisce reperibili in commercio, impregnti di reagente essiccato. Viene consigliato il derivato tetrametilico della *p*-fenilendiammina perché rappresenta un reagente più stabile durante la conservazione e, rispetto al derivato dimetilico, è più sensibile nella rilevazione della citocromo ossidasi ed è meno tossico. In entrambi i metodi, un'ansata della colonia sospetta viene applicata nella zona della carta di filtro contenente il reagente.

Interpretazione dei risultati

Le colonie batteriche che hanno l'attività citocromo ossidasica sviluppano un intenso color blu nel punto di inoculo entro 10 secondi. Ogni microrganismo che produce un colore blu entro 10–60 secondi deve essere ulteriormente esaminato perché è probabile che non appartenga alle *Enterobacteriaceae*.

3.1.16 PYR test

Il PYR test è stato descritto per la prima volta da Facklam e coautori nel 1982; da allora, è stato accettato come test rapido per l'identificazio-

ne presuntiva sia degli Streptococchi β -emolitici di gruppo A che degli Enterococchi.

Procedura del test

1. Con un'ansa batteriologica sterile, raccogliere il materiale di due o tre colonie morfologicamente simili e stemperarlo in un piccolo volume di brodo L-pirrolidonil- β -nafilammide (PYR).
2. Incubare la provetta a 37 °C per 4 ore.
3. Aggiungere una goccia del reagente PYR e osservare il cambiamento di colore. La reazione deve essere letta e registrata 1 minuto dopo l'aggiunta del reagente.

Interpretazione dei risultati

- Positivo: lo sviluppo di un intenso colore rosso ciliegia entro un minuto dall'aggiunta del reagente
- Negativo: un colore giallo o arancione.

3.1.17 Test di sensibilità a bacitracina e SXT

La sensibilità a basse concentrazioni dell'antibiotico polipeptidico bacitracina e alla combinazione di sulfonamide e trimetoprim-sulfametossazolo (SXT) offre un metodo facile ed economico per l'identificazione presuntiva degli Streptococchi β -emolitici sia di gruppo A che di gruppo B.

Gli Streptococchi di gruppo A sono sensibili a concentrazioni relativamente basse di bacitracina e sono resistenti alla combinazione SXT. Gli Streptococchi di gruppo B sono resistenti a entrambi gli antibiotici. Altri Streptococchi β -emolitici mostrano livelli variabili di sensibilità alla bacitracina, ma di solito questi microrganismi sono sensibili alla combinazione SXT.

Procedura del test

1. Scegliere da tre a quattro colonie isolate di *Streptococco* β -emolitico e strisciare l'inoculo fino al centro di una metà di una piastra di agar sangue.
2. Utilizzando un tampone sterile o un'ansa batteriologica, seminare a tappeto l'inoculo sull'intera metà della piastra.
3. Porre sterilmente un disco Taxo "A" di bacitracina e un disco SXT sull'area inoculata. Assicurarsi che i dischi siano spaziati regolarmente. Utilizzando pinze sterilizzate alla fiamma, premere delicatamente sui dischi per assicurarne il contatto con la superficie dell'agar.
4. Incubare la piastra a 37 °C per 24 ore.

Interpretazione dei risultati

- Sensibile (S): Qualunque zona intorno all'uno o all'altro disco
- Resistente (R): Crescita fino al bordo del disco

BACITRACINA	SXT	IDENTIFICAZIONE
S	R	Presunto Gruppo A
R	R	Presunto Gruppo B
S/R	S	Né gruppo A né gruppo B

- I risultati devono essere descritti come "Streptococchi β -emolitici, presuntivamente di gruppo A secondo il test bacitracina/SXT" oppure "Streptococchi β -emolitici, presuntivamente non di gruppo A secondo il test bacitracina/SXT".
- Dal momento che questi test sono generalmente eseguiti da isolati provenienti dal faringe, per cui sono stati ricercati gli Streptococchi di gruppo A, l'identificazione presuntiva di gruppo B, in genere, non viene riportata.

3.1.18 Test di sensibilità all'optochina

L'etilidrossicupreina cloridrato (optochina), un derivato dell'alcaloide naturale "chinino", inibisce in modo selettivo la crescita dello *Streptococcus pneumoniae* a concentrazioni molto basse (5 μ l/ml o inferiore). L'optochina può anche inibire altri streptococchi viridanti, ma solo a concentrazioni molto più elevate. Il test ha una sensibilità superiore al 95%, è semplice da eseguire ed è economico.

Procedura del test

1. Utilizzando un'ansa scegliere da tre a quattro colonie ben isolate del microrganismo in esame e strisciare una metà o un terzo di una piastra di agar sangue.
2. Mettere un disco di optochina nel terzo superiore dell'area strisciata. Premere il disco con pinze sterilizzate alla fiamma, in modo da farlo aderire fermamente alla superficie dell'agar.
3. Incubare la piastra a 37 °C per 18–24 ore in un incubatore con 5–7% di CO₂.

Interpretazione dei risultati

Gli streptococchi viridanti possono essere identificati presuntivamente come *S. pneumoniae* se mostrano un'area di inibizione di 14 mm o più ampia intorno a un disco di 6–mm (Taxo A), o un'area di 16 mm o più ampia intorno a un disco di 10–mm (Bacto) (fig. 3.7). I microrganismi che mostrano aree di inibizione di dimensioni inferiori devono essere esaminati per la loro solubilità nella bile (vedi paragrafo 3.1.13).

3.1.19 Interpretazione delle colture

L'interpretazione delle colture dopo 24–48 ore di incubazione richiede un considerevole livello di esperienza. Tale operazione viene svolta tenendo la piastra in una mano e osservando la superficie dell'agar per la



Figura 3.7: Suscettibilità all'optochina per l'identificazione di *Streptococcus pneumoniae* su agar sangue

presenza di un eventuale crescita batterica. Durante la valutazione, è opportuno inclinare le piastre in varie direzioni, sotto un'illuminazione chiara e diretta, in modo che la luce sia riflessa da vari angoli; al fine di agevolare la rivelazione delle colonie. Dalle osservazioni iniziali valutare la natura delle colonie isolate e decidere se siano richieste procedure aggiuntive. I parametri rilevanti comprendono: le caratteristiche e il numero relativo di ciascun tipo di colonia recuperata dai terreni contenenti agar, la purezza, reazione di gram e morfologia dei batteri in ciascuna tipologia di colonia, nonché le alterazioni subite dai terreni, che riflettono le attività metaboliche dei batteri presenti nelle colonie adiacenti.

Durante le fasi di raccolta dei campioni dai pazienti o nella gestione di tali campioni in laboratorio è possibile che vengano introdotti organismi estranei provenienti dall'ambiente o dalla flora indigena dei soggetti che manipolano la coltura. Può essere chiaro che una colonia sia di natura esogena se è presente sulla seconda o sulla terza area di strisciatura di una piastra senza che però si sia osservata cresciuta sull'iniziale zona di inoculazione.

3.1.20 Separazione di morfotipi batterici nelle colture miste

Quando si strisciano delle piastre di agar per l'isolamento, è agevole selezionare delle colonie isolate per la sottocoltura, in modo da ottenere isolati puri a partire da colture miste. Per la subcoltura diretta; toccare con attenzione la superficie della colonia desiderata con la punta di un ago (o di un'ansa) per l'inoculazione; strisciare una nuova piastra per l'isolamento.

3.1.21 Valutazione delle colture mediante colorazione di Gram

Le impressioni preliminari, che si basano sull'osservazione delle caratteristiche delle colonie, possono essere ulteriormente confermate studiando degli strisci con la colorazione di Gram. Si tocca dapprima la parte superiore e il centro della colonia da analizzare con la punta di un'ansa per inoculazione. La porzione della colonia da campionare viene emulsionata in una piccola goccia di acqua o di soluzione fisiologica su un vetrino per microscopio con lo scopo di disperdere le singole cellule batteriche. Dopo avere asciugato all'aria il vetrino, si effettua la colorazione di Gram come descritto nel paragrafo 3.1.9. Lo striscio colorato va esaminato al microscopio ottico usando un obiettivo con immersione in olio; in aggiunta alla reazione di colorazione di Gram sulle cellule batteriche (batteri gram-positivi e gram-negativi), tre altre caratteristiche aiutano a condurre un'identificazione preliminare degli isolati:

1. Le dimensioni e l'aspetto delle cellule batteriche.
2. La loro disposizione reciproca.
3. La presenza o assenza di specifiche strutture od organelli (spore, granuli metacromatici, corpi rigonfi o altre peculiarità).

Con le informazioni ottenute dalla disamina delle colonie batteriche e degli strisci di cellule evidenziate con la colorazione di Gram, ora il mi-

crobiologo può procedere nell'effettuazione dei particolari test in grado di fornire con tutta probabilità un'identificazione corretta.

3.1.22 Procedure rivolte all'identificazione preliminare degli isolati batterici

Quasi tutti i test usati per valutare l'attività biochimica o metabolica dei batteri con lo scopo di identificare un isolato sono eseguiti inoculando l'isolato primario su una serie di terreni differenziali di saggio oppure all'interno di soluzioni. L'osservazione e interpretazione iniziale dei terreni di coltura va impiegata per determinare se valga la pena di condurre un'ulteriore identificazione del microrganismo, oppure dei microrganismi, e se sia il caso di effettuare dei test di suscettibilità antibiotica.

Quelli esposti nel seguito sono test diretti che si possono eseguire su colonie recuperate da piastre di colture primarie:

- **Test della catalasi.** Il test della catalasi (vedi paragrafo 3.1.11) viene usato con maggior frequenza allo scopo di distinguere gli stafilococchi (positivi) dagli streptococchi (negativi) o *Bacillus* spp. (positive) da *Clostridium tertium* (negativo).
- **Test di solubilità biliare.** Il test di solubilità biliare (vedi paragrafo 3.1.13) viene usato per l'identificazione di *Streptococcus pneumoniae*.
- **Test della coagulasi su vetrino.** È un test (vedi paragrafo 3.1.12) per l'identificazione di stafilococchi coagulasi-positivi (es. *S. aureus*).
- **Spot test diretto dell'indolo.** Questo test (vedi paragrafo 3.1.14) è utile per identificare *Escherichia coli* su isolati provenienti dal tratto urinario, dopo l'interpretazione primaria su agar MacConkey.
- **Test della citocromo ossidasi.** I test della citocromo ossidasi (vedi paragrafo 3.1.15) si rivelano utili ai fini della classificazione iniziale di numerose specie batteriche che presentano una morfologia peculiare delle colonie; di queste ultime, quelle ossidasi-positive possono

essere fatte rientrare nelle *Enterobacteriaceae*, che sono tutte negative, mentre le specie batteriche che producono citocromo ossidasi includono *Aeromonas* spp., *Plesiomonas* spp., *Pseudomonas* spp. e *Pasteurella* spp.

- **Test PYR.** Il substrato L-pirrolidonil- β -nafilammide (PYR) costituisce una semplice metodica per identificare celermente gli enterococchi (vedi paragrafo 3.1.16).

3.1.23 Identificazione di *Staphylococcus aureus*

I metodi principali per l'identificazione di *S. aureus* sono:

- **Fermentazione del mannitolo:** *S. aureus*, diversamente da numerose altre specie coagulasi-negative, è in grado di fermentare il mannitolo con formazione di acido. Il terreno usato è l'agar sale mannite che contiene mannitolo (1%), cloruro di sodio (7,5%), rosso fenolo e peptoni. L'elevata concentrazione del sale impedisce la crescita degli altri microrganismi (eccetto per gli enterococchi) e rende il terreno altamente elettivo per gli stafilococchi. La crescita di questo batterio si evidenzia con la formazione di un alone giallo che indica la produzione di acido (fig. 3.8). Tuttavia anche altre rare specie di stafilococchi possono produrre acido dal mannitolo, quindi è bene che in presenza di microrganismi mannitolo-positivi venga fatta un test della coagulasi su vetrino.

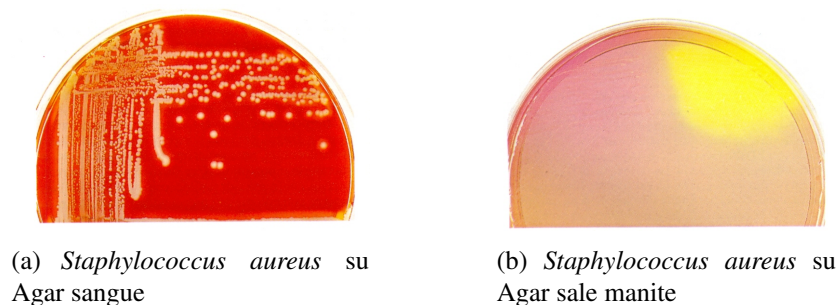


Figura 3.8: Coltura di *Staphylococcus aureus*

- **Test della coagulasi su vetrino:** il test tradizionalmente viene effettuato su vetrino o in provetta (vedi paragrafo 3.1.12). La maggior parte dei ceppi di *S. aureus* presenta una coagulasi legata o “clumping factor” sulla superficie della parete cellulare. Questo fattore reagisce direttamente con il fibrinogeno del plasma, provocando una rapida agglutinazione delle cellule (fig. 3.5(a)). Tutti i ceppi risultanti negativi al test della coagulasi su vetrino devono essere sottoposti a conferma mediante il test della coagulasi in provetta poiché i ceppi che non hanno il clumping factor di solito producono coagulasi libera.
- Altra prova della coagulasi è l'**agglutinazione del lattice:** la tecnica prevede l'uso di particelle di lattice legate al plasma. Mettendo a contatto una sospensione batterica ed una di particelle di lattice, si produce una rapida agglutinazione (fig. 3.5(c)).

3.1.24 Identificazione di *Streptococcus pyogenes*

I metodi principali per l'identificazione di *S. pyogenes* sono:

- **Morfologia delle colonie:** Dopo 18–24 ore di incubazione su agar sangue, le colonie di *Streptococcus* β -emolitici del gruppo A hanno un diametro di circa 0,5 mm, sono traslucide o trasparenti, e hanno una superficie liscia o rugosa. La zona di β -emolisi è in genere da due a quattro volte più grande del diametro della colonia. Le colonie sono prominenti e hanno un bordo netto (fig. 3.9).
- **Sensibilità alla bacitracina:** Il test di sensibilità alla bacitracina è usato per l'identificazione presuntiva degli streptococchi β -emolitici del gruppo A (*Streptococcus pyogenes*). Il test è condotto su Agar sangue con un dischetto di bacitracina (vedi paragrafo 3.1.17).
- **Test della pirrolidonil arilamidasi (PYR):** Il test dell'idrolisi della PYR (vedi paragrafo 3.1.16) è un test presuntivo per *Streptococcus pyogenes* e gli enterococchi. Esso sostituisce il test della ba-



Figura 3.9: *Streptococcus pyogenes* su Agar sangue

citracina e quello dell'alo-tolleranza rispettivamente per gli streptococchi del gruppo A e per le specie di *Enterococcus*. L'enzima messo in evidenza è chiamato pirrolidonil arilamidasi. Il microrganismo in esame viene inoculato in un brodo contenente PYR e lasciato ad incubare a 37 °C per 4 ore. In questo intervallo il PYR viene idrolizzato. Il β -naftalamide libero viene poi rilevato mediante aggiunta della sostanza di copulazione per coloranti azoici N,N-dimetilaminocinnamaldehyde. Se la PYR è stata idrolizzata, si sviluppa una colorazione rossa. Questo test è molto sensibile e specifico per gli streptococchi del gruppo A e per maggior parte delle specie di *Enterococcus*.

3.1.25 Identificazione di *Streptococcus pneumoniae*

- **Morfologia delle colonie:** *S. pneumoniae* può presentarsi con uno spettro di diversi tipi di colonie, a seconda della quantità del materiale capsulare presente. Queste colonie sono generalmente circondate da una larga zona di α -emolisi verde intenso. Le colonie dei ceppi dotati di una capsula spessa possono raggiungere parecchi millimetri di diametro, sono molto mucoidi, appaiono grigie e assomigliano a gocce di olio sulla superficie dell'agar. Le colonie dei ceppi con capsula meno abbondante sono più piccole. Dopo incubazione prolungata, la parte centrale delle colonie può collassare, conferendo il

caratteristico aspetto a “pedina di dama”. Alcune colonie possono collassare interamente, assumendo l’aspetto di una testa di chiodo piatta sulla superficie dell’agar (fig. 3.10).

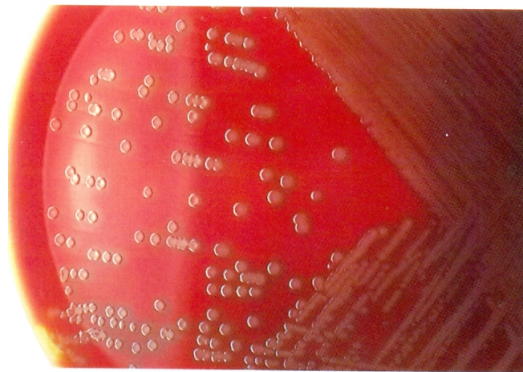


Figura 3.10: *Streptococcus pneumoniae* su agar sangue

- **Sensibilità all’optochina:** La sensibilità all’optochina (etilidrocupreina cloridrato) è utilizzata per differenziare *S. pneumoniae* dagli altri streptococchi viridanti (vedi paragrafo 3.1.18). Per una corretta interpretazione è necessario misurare gli aloni (a differenza del test della bacitracina e quello del SXT). Un alone di 14 mm o più grande attorno al dischetto di 6 mm indica una sensibilità all’optochina ed indica il microrganismo come uno pneumococco (fig. 3.7). Se l’alone è inferiore a 14 mm, dovrebbe essere eseguito un test alternativo di identificazione (ad es., sierologico o il test di solubilità nella bile) perché alcuni streptococchi viridanti e gli aerococchi possono presentare piccoli aloni di inibizione.
- **Test di solubilità nella bile:** Il test di solubilità nella bile è un altro test per l’identificazione di *S. pneumoniae*. Tale esame può essere condotto su sospensioni del microrganismo in brodo o in fisiologica o direttamente (vedi paragrafo 3.1.13 e fig. 3.6).

3.1.26 Suscettibilità agli antibiotici

Per una corretta terapia antibatterica è necessario conoscere oltre all'identità dell'agente patogeno anche la sua suscettibilità ai chemioterapici.

Il test di Kirby-Bauer è quello frequentemente più usato per guidare la terapia.

Metodo di Kirby-Bauer

Procedimento:

1. Preparare una sospensione batterica di 0,5 McFarland.
2. Usando un tampone, seminare sull'intera superficie di una piastra di Müller-Hinton in maniera uniforme, ripetere l'operazione più volte ruotando la piastra di 60 gradi ogni volta.
3. Entro 15 minuti applicare sulla piastra seminata i dischi di antibiotici o mediante pinze sterili o per mezzo di un distributore automatico multiplo. Assicurarsi che ci sia perfetta aderenza tra il disco e la superficie dell'agar premendo con una pinza sterile su ogni disco. I dischi devono avere una distanza dai margini della piastra non inferiore ai 25 mm e fra di loro non inferiore ai 24 mm (calcolata dal centro di un disco al centro di un altro disco).
4. Capovolgere le piastre ed incubarle, entro 15 minuti dall'applicazione dei dischi, a 37 °C per 16–18 ore.

Risultati:

1. Misurare con un doppio decimetro il diametro degli aloni di inibizione (fig. 3.11) sul fondo della piastra posta contra una sorgente luminosa.
2. Interpretare i risultati in base allo schema di lettura riportato nella tabella 3.1.

Tabella 3.1: Schema di interpretazione degli aloni di inibizione

Antibiotico	Concentrazione	Misura del diametro in (mm)		
		Resistente	Intermedia	Sensibile
Acido nalidixico	30 mcg	≤ 13	14–18	≥ 19
Acido pipemidico	20 mcg	≤ 13	14–18	≥ 19
Amikacina	10 mcg	≤ 11	12–13	≥ 14
Ampicillina (Enterobatteri- Enterococchi)	10 mcg	≤ 11	12–13	≥ 14
Ampicillina (Stafilococchi)	10 mcg	≤ 20	21–28	≥ 29
Ampicillina (Emofili)	10 mcg	≤ 19	–	≥ 20
Carbenicillina (<i>Proteus</i> sp., <i>E. coli</i>)	100 mcg	≤ 17	18–22	≥ 23
Carbenicillina (<i>P. aeru-</i> <i>ginosa</i>)	100 mcg	≤ 13	14–16	≥ 17
Cefalosporine	30 mcg	≤ 14	15–17	≥ 18
Cloramfenicolo	30 mcg	≤ 12	13–17	≥ 18
Clindamicina	2 mcg	≤ 14	15–16	≥ 17
Colistina	10 mcg	≤ 8	9–10	≥ 11
Eritromicina	15 mcg	≤ 13	14–17	≥ 18
Fosfomicina	50 mcg	≤ 10	11–14	≥ 15
Gentamicina	10 mcg	≤ 12	–	≥ 13
Kanamicina	30 mcg	≤ 13	14–17	≥ 18
Meticillina (Stafilococ- chi)	5 mcg	≤ 9	10–13	≥ 14
Neomicina	30 mcg	≤ 12	13–16	≥ 17
Nitrofurantoina	300 mcg	≤ 14	15–16	≥ 17
Penicillina G (Stafilo- cocchi)	10 U	≤ 20	21–28	≥ 29
Penicillina G (altri mi- croorganismi)	10 U	≤ 11	12–21	≥ 22
Rifampicina	30 mcg	≤ 11	12–18	≥ 19
Sisomicina	10 mcg	≤ 16	–	≥ 17
Streptomicina	10 mcg	≤ 11	12–14	≥ 15
Tetraciclina	30 mcg	≤ 14	15–18	≥ 19
Tobramicina	10 mcg	≤ 11	12–13	≥ 14
Trimethoprim- Sulfamethossazolo	1,75 mcg 23,25 mcg	≤ 10	11–15	≥ 16

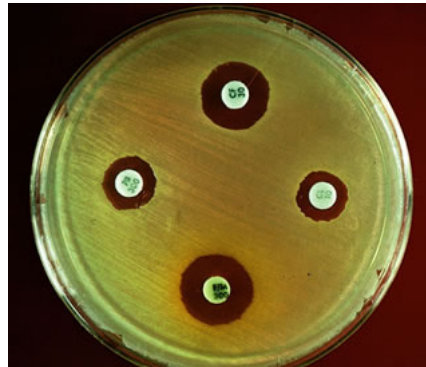


Figura 3.11: Metodo di Kirby-Bauer: aloni di inibizione su agar Müller-Hinton

Test epsilometrico (E-test)

L'E-test è un metodo quantitativo per la determinazione della minima concentrazione inibente (MIC) quale strumento per valutare la sensibilità e resistenza dei microrganismi agli antimicrobici. Il test mediante gradiente di diffusione impiega una striscia di plastica non porosa che è stata calibrata con valori di MIC comprendenti 15 diluizioni doppie. Il principio è un'estensione del metodo del disco di diffusione ed il protocollo per preparare l'inoculo è uguale. L'agente antimicrobico contenuto nelle strisce è graduato, le concentrazioni sono scritte linearmente lungo la striscia (fig. 3.12). Dopo l'incubazione la MIC è letta dal punto sulla striscia dove passa la zona di inibizione della crescita.

La diffusione degli agenti antimicrobici comincia immediatamente dopo aver applicato la striscia, che non può, pertanto, essere rimossa una volta che è stata toccata la superficie dell'agar.

Procedimento:

1. Preparare una sospensione batterica di 0,5 McFarland.
2. Usando un tampone, seminare sull'intera superficie di una piastra di Müller-Hinton in maniera uniforme, ripetere l'operazione più volte ruotando la piastra di 60 gradi ogni volta.

3. Applicare sulla piastra seminata la striscia(e) alla superficie di agar utilizzando le pinze o un applicatore, con la scala MIC rivolta verso l'alto.
4. Capovolgere le piastre ed incubarle a 37 °C per 16–18 ore.

Risultati:

1. Dopo l'incubazione appropriato, interpretare il test soltanto se vi è stata una crescita adeguata e se l'ellisse di inibizione è chiaramente visibile.
2. Leggere la MIC dove una zona di inibizione chiaramente definita interseca la striscia (fig. 3.12).



Figura 3.12: E-test per *Proteus vulgaris* su agar Müller-Hinton. La MIC dell'isolato è letta dove la linea dell'inibizione di crescita incrocia la striscia

3.1.27 Diagnostica microscopica di infezione tubercolare polmonare attiva

La colorazione acido-alcool resistenza (carbol fucsina a caldo) è stata messa a punto per la prima volta nel 1882 da Franz Ziehl, microbiologo tedesco, che impiegò la carbol fucsina per documentare il micobatterio della tubercolosi; successivamente nel 1892, Friederich Carl Adolf Neelsen, patologo tedesco, pubblicò il metodo.

Attualmente il metodo è conosciuto come colorazione di Ziehl-Neelsen (acido-alcool resistenza), ed è la base per riconoscere i micobatteri.

I micobatteri, dopo essere stati colorati a caldo con la fucsina di Ziehl, hanno la capacità di trattenere il colore anche se trattati con i più energici decoloranti, come l'alcool e gli acidi minerali. La proprietà dell'acido-alcool resistenza è legata alla parete spessa e cerosa che circonda le cellule micobatteriche. La parete deve essere "ammorbidita" per consentire la penetrazione, attraverso lo strato ceroso, della carbolfucsina, che è una soluzione acquosa.

Digestione e decontaminazione dell'espettorato

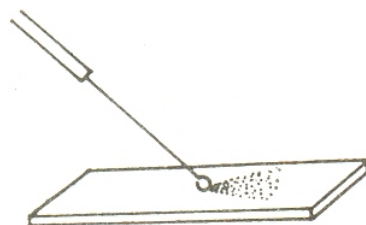
L'elevata concentrazione di lipidi nella parete cellulare della maggior parte dei micobatteri li rende più resistenti all'azione battericida da parte di soluzioni di forti acidi e alcali, rispetto ad altri batteri che potrebbero essere presenti nel campione. Di conseguenza, i campioni che potrebbero contenere una flora batterica mista vengono trattati con agenti decontaminanti per ridurre l'eccessiva crescita di batteri non desiderati e per fluidificare il muco. Dopo la decontaminazione, la miscela viene centrifugata ad alta velocità per concentrare i micobatteri.

Procedure di digestione e decontaminazione dell'espettorato

1. Portare a volume di 5 mL l'espettorato con soluzione fisiologica.

2. Aggiungere 5 mL della soluzione di digestione e decontaminazione “BBL MycoPrepTM Reagente” (Becton, Dickinson and Company “BD”).
3. Agitare con vortex per qualche secondo.
4. Lasciare agire a temperatura ambiente per 15 minuti.
5. Aggiungere 40 mL di tampone fosfato pH 6,8, per bloccare la digestione e la decontaminazione dell’espettorato.
6. Centrifugare a 4.200 giri/minuto per 20 minuti.
7. Eliminare il surnatante
8. Aggiungere 1,5 mL di tampone fosfato pH 6,8 al precipitato.
9. Agitare con vortex per qualche secondo.

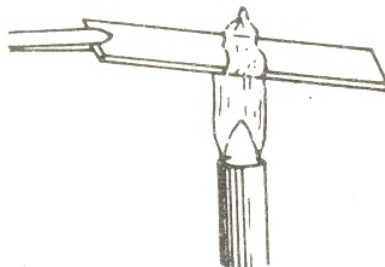
Allestimento di un espettorato per esame batterioscopico



Depositare una goccia della soluzione fissativa al centro del vetrino.

Aggiungere una goccia dell’espettorato decontaminato e digerito accanto a quella fissativa, miscelare le due gocce e distendere la miscela con un ansa.

Lasciare asciugare la miscela a temperatura ambiente.



Dopo che la miscela è asciutta, fissare il campione al vetrino passando lentamente tre volte sulla fiamma aerea. Lasciare raffreddare il vetrino prima della colorazione.

Procedimento della colorazione di Ziehl-Neelsen (acido-alcool-resistenza)

1. Dopo il raffreddamento del vetrino allestito di un espettorato (vedi paragrafo “Allestimento di un espettorato per esame batterioscopico”, pag. 93), coprirlo con il colorante carbolfucsina⁶.
2. Riscaldare fino all’evaporazione, ma non lasciarlo seccare. Il colorante carbolfucsina, che penetra attraverso la parete ammorbidita con il calore, si lega alla parete cellulare; quindi, con il successivo raffreddamento delle cellule batteriche, la cera si indurisce nuovamente, proteggendo il colorante legato dall’azione della soluzione decolorante di acido e alcol “acido-alcool resistenza”.
3. Lasciare agire a temperatura ambiente per 5 minuti.
4. Lavare il vetrino con acqua di fonte.
5. Decolorare con soluzione acido-alcool⁷ per 30–60 secondi.
6. Lavare il vetrino con acqua di fonte.
7. Coprire il vetrino con la soluzione di blue di metilene⁸.
8. Lasciare a temperatura ambiente per 2–3 minuti.
9. Lavare con acqua di fonte ed asciugare il vetrino.
10. Esaminare con un obiettivo da 100× ad immersione in olio.

I batteri acido-alcool resistenti conservano la colorazione fucsina rossa; tutti gli altri elementi vengono prima scolorati dalla miscela acido-alcool, poi ricolorati dal colorante di contrasto (blue di metilene) in azzurro, di modo che all’osservazione microscopica con l’obiettivo 100×

⁶Sciogliere 3 g di fucsina basica in 10 ml di etanolo al 90–95%. Aggiungere 90 ml di una soluzione acquosa di fenolo al 5%.

⁷Aggiungere lentamente 3 ml di HCl concentrato a 97 ml di etanolo al 90–95%. La soluzione può diventare bollente.

⁸Sciogliere 0,3 g di blu di metilene cloruro in 100 ml di acqua distillata.

ad immersione in olio, si vedono i batteri acido-alcool resistenti rossi in campo azzurro, (fig.3.13).

La presenza di bacilli acido-alcool resistenti nell'espettorato, in combinazione con un'anamnesi di tosse, perdita ponderale e con l'evidenza, nella radiografia del torace, di un infiltrato polmonare, rappresenta ancora un'evidenza presuntiva di tubercolosi attiva.

È stato stimato che sono necessari circa 10.000 bacilli acido-alcool resistenti per millilitro di espettorato, per consentirne l'identificazione mediante un esame microscopico di routine [20]. I pazienti con una malattia diffusa eliminano grandi quantità di micobatteri. In questi casi, si osserva una elevata concordanza tra la positività dell'esame microscopico e di quello colturale. Molti pazienti presentano una malattia molto lieve o meno avanzata, e, in questo caso, la correlazione tra l'esame microscopico e colturale può limitarsi solo al 25–40%.

Lo striscio colorato per l'acido-alcool resistenza è utile anche per seguire la risposta al trattamento farmacologico. Dopo avere iniziato il trattamento con i farmaci anti-tubercolari, le colture diventano negative prima degli strisci, suggerendo che i microrganismi non sono più capaci di replicarsi, ma possono legare il colorante. Continuando con il trattamento, un maggior numero di microrganismi viene ucciso e ne viene eliminata con l'espettorato, una quantità minore, cosiché valutare il numero di microrganismi nell'escreato durante il trattamento può fornire una iniziale misura obiettiva della risposta. Se, dopo l'inizio della terapia, il numero dei microrganismi non dovesse diminuire, si deve considerare la possibilità che vi sia una resistenza al farmaco, e pertanto dovrebbero essere condotti ulteriori studi culturali e di suscettibilità agli antibiotici.

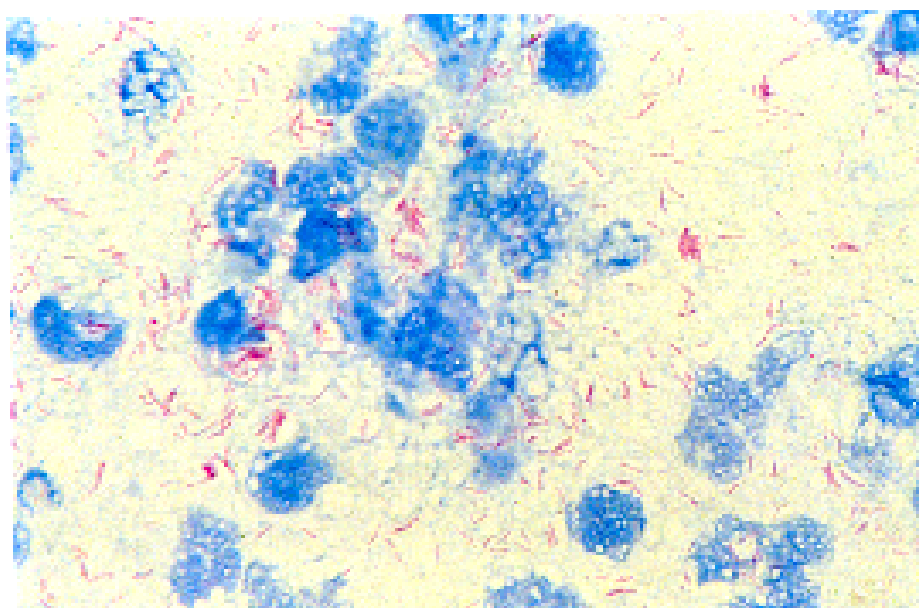


Figura 3.13: All'osservazione microscopica del vetrino con l'obiettivo 100× ad immersione in olio; i batteri acido-alcool resistenti si vedono rossi in campo azzurro.

3.1.28 Terapia anti-tubercolare polmonare

Farmaci di prima linea	Farmaci di Seconda linea
Isoniazide	Acido p-ammino salicilico (PAS)
Rifampicina	Kanamicina
Etambutolo	Amikacina
Pirazinamide	Capreomicina
Streptomina	Etionamide
	Cicloserina
	Terizidone
	Tioacetazone
Farmaci di recente introduzione	
Derivati rifamicinici:	Rifabutina
	Rifapentina
	Ofloxacina
Fluorochinoloni:	Ciprofloxacina
	Lomefloxacina
	Sparfloxacina
Nuovi macrolidi:	Claritromicina
	Azitromicina
Fenazinici:	Clofazimina

La terapia anti-tubercolare, usando i farmaci di prima linea può essere divisa in due protocolli:

-
1. Un protocollo è caratterizzato dalla durata di terapia di 9 mesi e si basa sulla somministrazione di:
 - una fase di attacco intensa della durata di 3 mesi: Isoniazide, Rifampicina e Etambutolo o Streptomina.
 - una fase di mantenimento a lungo termine della durata di 6 mesi: Isoniazide e Rifampicina.
-
2. Un altro protocollo è caratterizzato dalla durata di terapia di 6 mesi e si basa sulla somministrazione di:
 - una fase di attacco intensa della durata di 2 mesi: Isoniazide, Rifampicina, Etambutolo o Streptomina e pirazinamide.
 - una fase di mantenimento a lungo termine della durata di 4 mesi: Isoniazide e Rifampicina.
-

Tabella 3.2: Posologia e via di somministrazione dei farmaci anti-tubercolari di prima scelta

Farmaci	Posologia e via di somministrazione
Isoniazide:	5 mg/kg/die, una volta al giorno; per OS
Rifampicina:	10 mg/die, una volta al giorno nella fase di attacco intensa; 15 mg/kg/die, 2-3 volte alla settimana nella fase di mantenimento a lungo termine; per OS
Etambutolo:	15 mg/kg/die una volta al giorno oppure 50 mg/kg due volte alla settimana; per OS
Pirazinamide:	20-35 mg/kg/die, 3-4 volte al giorno. Alternativamente si somministrano 50 mg/kg tre volte alla settimana o 75 mg/kg due volte alla settimana; per OS
Streptomina:	15-20 mg/kg/die fino a un massimo di 1 g al giorno; per via parenterale

3.1.29 Meccanismo d'azione dei farmaci anti-tubercolari di prima linea

Isoniazide

È ancora considerato (fig.3.14(a)), il principale farmaco per la chemioterapia anti-tubercolare. L'isoniazide risulta battericida sia in vivo che in vitro nei confronti dei bacilli in fase attiva di moltiplicazione, mentre è batteriostatica nei confronti dei bacilli quiescenti.

La principale azione del farmaco consiste nell'inibizione della sintesi degli acidi micolici. L'isoniazide può avere anche effetti sulla biosintesi degli acidi nucleici e sulla glicolisi.

La resistenza alla isoniazide si sviluppa rapidamente se il farmaco viene utilizzato da solo ed il meccanismo della resistenza pare sia in rapporto alla incapacità del farmaco di entrare nel microorganismo o di essere captato da esso. La resistenza può essere ritardata o prevenuta associando l'isoniazide ad altri agenti antimicobatterici.

Rifampicina

La rifampicina (fig:3.14(c)) è un derivato semisintetico dell'antibiotico naturale rifamicina B, prodotta da *Streptomyces mediterranei*. La rifampicina inibisce la RNA polimerasi DNA-dipendente, inibendo la trascrizione; ciò si verifica a basse concentrazioni nei batteri, mentre perché venga inibita la sintesi di RNA nei mammiferi sono richieste concentrazioni molto più alte. La rifampicina ha un'azione battericida nei confronti di *Mycobacterium tuberculosis* (MIC di 0,005–0,2 mg/l) sia intracellulari che extracellulari; possiede infatti la capacità di eliminare gli organismi quiescenti o persistenti che hanno trovato una nicchia biologica nelle cellule del sistema fagocitico (attività sterilizzante). La rifampicina aumenta in vitro l'attività di streptomina e isoniazide, ma non quella dell'etambutolo.

Etambutolo

L'etambutolo (fig.3.14(b)) è un prodotto di sintesi che è stato introdotto nella pratica terapeutica nel 1962. L'etambutolo è un tubercolostatico attivo nei confronti di microorganismi del genere *Mycobacterium*, tra cui *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. marinum* e alcuni ceppi di *M. kansasii*, *M. avium*, *M. fortuitum* e *M. intracellulare*. Sembra agire solo durante la fase di proliferazione batterica; si tratterebbe dell'inibizione della sintesi di uno o più metaboliti essenziali.

Pirazinamide

La pirazinamide, sintetizzato, nel 1952 (fig.3.14(d)), è un farmaco anti-tubercolare battericida nei confronti di *Mycobacterium tuberculosis* intracellulare⁹; in vitro non sembra avere attività verso altri micobatteri o microorganismi. La pirazinamide per essere battericida utilizza un enzima prodotto dal batterio, la pirazinamidasi, che libera l'amide con formazione di acido pirazinoico, responsabile dell'attività. La pirazinamide e la rifampicina sono particolarmente efficaci verso bacilli semiquiescenti con attività metabolica lenta o intermittente. La resistenza alla pirazinamide si sviluppa rapidamente quando questa è utilizzata in monoterapia.

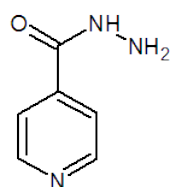
Streptomicina

La streptomicina (fig.3.14(e)), come gli altri aminoglicosidi, ha un'azione battericida. Essa viene trasportata attivamente attraverso la membrana cellulare batterica per mezzo di un sistema ossigeno-dipendente. L'antibiotico viene inattivato in condizioni anaerobiche. La streptomicina si lega ai poliribosomi e inibisce la sintesi delle proteine. Il farmaco si lega alla subunità 30S dei ribosomi batterici. Cambiamenti in queste proteine influenzano in maniera rilevante l'attività della streptomicina. La sostituzione di un solo aminoacido, ad esempio di un'arginina con una lisina in posizione 42 della proteina ribosomiale S12, impedisce il legame della

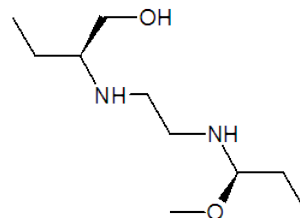
⁹Il farmaco agisce solo a valori di pH acido che si ritrovano all'interno della cellula e non a pH neutro.

streptomicina e crea un mutante completamente resistente all'azione dell'antibiotico. La sintesi proteica nei batteri viene bloccata per inibizione del trasferimento del peptidil-tRNA associato alla translocazione. La streptomicina provoca, inoltre, la lettura errata del codice genetico poiché causa una incorretta interazione tra codone e anticodone. Il farmaco risulta più efficace in ambiente alcalino.

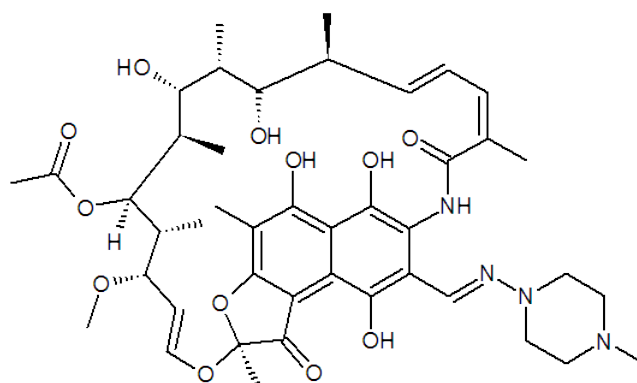
La streptomicina è uno degli antibiotici di scelta nel trattamento delle infezioni da *Mycobacterium tuberculosis* ma, sfortunatamente, la resistenza compare molto rapidamente se viene utilizzato in monoterapia. Non essendo assorbito per via orale, deve essere somministrato per via parenterale.



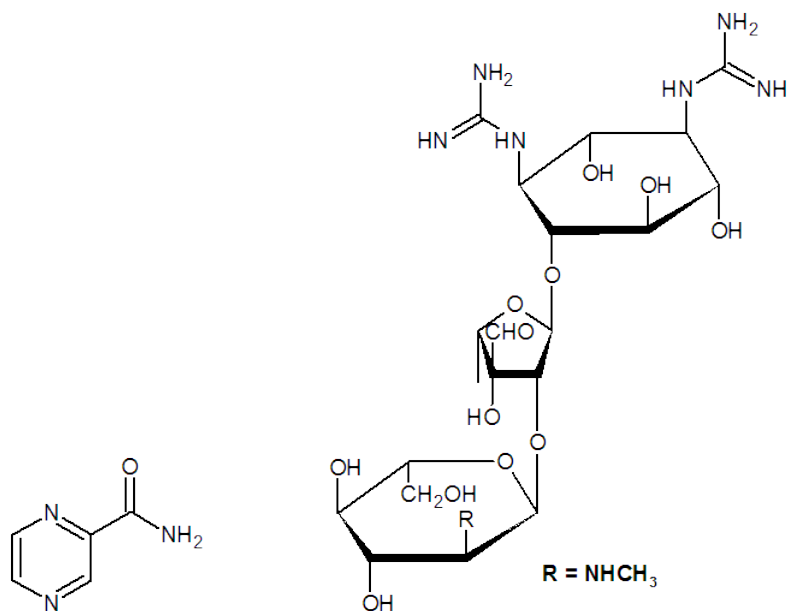
(a) Isoniazide



(b) Etambutolo



(c) Rifampicina



(d) Pirazinamide

(e) Streptomicina

Figura 3.14: Farmaci anti-tubercolari di prima scelta

3.1.30 Sistemi BD BACTECTM FX (Becton, Dickison and Company) e Bact/ALLERT 3D (bioMérieux)

I Sistemi BD BACTECTM FX (Becton, Dickison and Company) e Bact/ALLERT 3D (bioMérieux), con tecnologia di rilevazione in fluorescenza, per l'esame delle emocolture, sono costituiti da un modulo strumentale completamente automatico, con le caratteristiche combinate di:

- Incubatore
- Agitatore
- Lettore.

Incubazione

L'incubazione continua dei flaconi in esame è consentita da una struttura a stazioni termostata (a 35 °C ± 1.5), nella quale le stazioni sono disposte in file orizzontali all'interno di rack.

Agitazione

L'agitazione programmata è legata al movimento degli stessi rack. I campioni sono mantenuti in agitazione da un sistema meccanico di inclinazione (da orizzontale a 20°). Ogni rack effettua 30 movimenti completi al minuto.

Lettura

La lettura in continuo, per la quale ogni flacone risulta letto ogni 10 minuti, è legata ad un sofisticato meccanismo su base ottica che sfrutta la produzione di CO₂ del metabolismo batterico.

3.1.31 Sistemi API (bioMérieux)

Nella maggior parte dei casi lo studio di una sola attività metabolica non permette di discriminare tutte le specie all'interno di una famiglia. Di solito sono necessarie più attività metaboliche. Il tutto ovviamente sarebbe molto laborioso, se non esistessero dei sistemi prodotti industrialmente. Nel laboratorio, i campioni sono stati esaminati usando soprattutto due sistemi prodotti industrialmente: un sistema VITEK 2 (bioMérieux), (vedi paragrafo 3.1.32) completamente automatico ed un sistema API (bioMérieux) manuale.

API (bioMérieux) è un sistema biochimico prodotto industrialmente dove le reazioni tra miscela ed il substrato avvengono in microprovette. Questo permette di studiare più attività enzimatiche (fino a 20) in poco spazio.



È un sistema di identificazione per enterobatteri ed altri batteri gram-negativi, batteri gram-positivi, anaerobi e miceti che utilizza test biochimici standardizzati e miniaturizzati.

Le gallerie consistono in microtubi contenenti terreni disidratati. I test vengono inoculati con una sospensione batterica che ricostituisce i terreni. Le reazioni prodotte durante il periodo di incubazione si traducono in viraggi colorati spontanei o rilevati dall'aggiunta di reattivi. La lettura di queste reazioni si effettua con l'aiuto delle tabelle di lettura e l'identificazione con tabelle di identificazione dell'indice analitico o dal programma di identificazione.

Esistono diversi sistemi API, a seconda dell'attività metaboliche ricercate, che a sua volta dipendono dalla famiglia di appartenenza del batterio che vogliamo studiare:

API Staph (bioMérieux)

API STAPH è un sistema di identificazione dei generi *Staphilococcus*, *Micrococcus* e *Kocuria* che utilizza test biochimici standardizzati e miniaturizzati ed una base dei dati specifica.

La galleria API Staph è composta da 20 microprovette contenenti i substrati dei test disidratati.

Procedimento

1. Preparazione della galleria:

- riunire fondo e coperchio di una vaschetta di incubazione e distribuire circa 5 ml d'acqua distillata negli alveoli per creare un ambiente umido
- annotare il riferimento del ceppo sulla linguetta laterale della vaschetta
- estrarre la galleria dalla confezione
- mettere la galleria nella vaschetta di incubazione.

2. Preparazione dell'inoculo:

- aprire una fiala di API Staph Medium
- preparare una sospensione batterica omogenea, di 0,5 McFarland.

3. Inoculo della galleria:

- servendosi di una pipetta, inoculare le microprovette della galleria con API Staph Medium insemato.
- creare l'anaerobiosi nei test ADH e URE riempiendo la cupola con olio di paraffina fino a formare un menisco convesso
- ricoprire la vaschetta di incubazione
- incubare a 36 ± 2 °C per 18–24 ore.

API 20 Strep (bioMérieux)

API 20 Strep è un sistema standardizzato composto da 20 test biochimici ad elevata discriminazione. Permette di identificare a livello del gruppo o di specie la maggior parte degli streptococchi e degli enterococchi e degli altri germi più comuni ad essi correlati.

La galleria API 20 Strep è costituita da 20 microprovette contenenti substrati disidratati per la rivelazione delle attività enzimatiche o della fermentazione degli zuccheri.

Procedimento

1. Preparazione della galleria:

- riunire fondo e coperchio di una vaschetta di incubazione e distribuire circa 5 ml di acqua distillata nei pozzetti per creare un ambiente umido
- annotare il riferimento del ceppo sulla linguetta laterale della vaschetta
- estrarre la galleria dal suo involucro
- mettere la galleria nella vaschetta di incubazione.

2. Preparazione dell'inoculo:

- aprire una fiala di API Suspension Medium (2 ml)
- preparare una sospensione batterica piuttosto densa con opacità superiore al punto 4 di McFarland.

3. Inoculo della galleria:

- nella prima metà della galleria (test da VP ad ADH): distribuire la sospensione preparata evitando la formazione di bolle
 - per i test da VP a LAP: distribuire circa 100 μ l in ciascuna cupola
 - per il test ADH: riempire unicamente la provetta

- nella seconda metà della galleria (test da RIB a GLYG):
 - aprire una fiala di API GP Medium e trasferirvi il resto della sospensione, ossia al minimo 0,5 ml. Omogeneizzare bene
 - distribuire questa nuova sospensione solo nelle provette
- riempire con olio di paraffina le cupole dei test sottolineati da ADH a GLYG fino a formare un menisco convesso
- chiudere la vaschetta di incubazione
- incubare a 36 ± 2 °C in anaerobiosi per 4–4,5 ore per una prima lettura ed eventualmente, se necessario, per 24 ore (± 2 ore) per una seconda lettura.

API 20 E (bioMérieux)

API 20 E è un sistema standardizzato per l'identificazione delle *Enterobacteriaceae* e di altri bacilli Gram negativi non esigenti, che comprende 21 test biochimici miniaturizzati, oltre ad una base dati specifica.

La galleria API 20 E è composta da 20 microprovette contenenti i substrati dei test disidratati.

Procedimento

1. Preparazione della galleria:

- riunire fondo e coperchio di una vaschetta di incubazione e distribuire circa 3 ml di acqua distillata negli alveoli del fondo per creare un ambiente umido
- annotare il riferimento del ceppo sulla linguetta laterale della vaschetta
- estrarre la galleria dal suo involucro
- mettere la galleria nella vaschetta di incubazione.

2. Preparazione dell'inoculo:

- aprire una fiala di API NaCl 0,85% Medium (5 ml) o una fiala di API Suspension Medium (5 ml)
- servendosi di una pipetta, prelevare una sola colonia ben isolata su terreno agarizzato
- mescolare accuratamente per realizzare una sospensione batterica omogenea.

3. Inoculo della galleria:

- riempire microprovette e cupole dei test CIT, VP e GEL con la sospensione batterica servendosi della pipetta utilizzata per il prelievo
- riempire solo le microprovette (e non le cupole) degli altri test
- creare un'anaerobiosi nei test: ADH, LDC, ODC, H₂S e URE riempiendo le cupole con olio di paraffina
- richiudere la vaschetta di incubazione
- incubare a 36 ± 2 °C per 18–24 ore.

API 20 NE (bioMérieux)

API 20 NE è un sistema standardizzato per l'identificazione di bacilli gram-negativi, non esigenti, non enterici (per es. *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Vibrio*, *Aeromonas*, ecc.), che utilizza 8 test convenzionali, 12 test di assimilazione ed una base dei dati.

La galleria API 20 NE è composta da 20 microprovette contenenti i substrati dei test disidratati.

Procedimento

1. Preparazione della galleria:

- riunire fondo e coperchio di una vaschetta di incubazione e distribuire circa 5 ml di acqua distillata negli alveoli del fondo per creare un ambiente umido

- annotare il riferimento identificativo del ceppo sulla linguetta laterale della vaschetta
- estrarre la galleria dalla confezione
- mettere la galleria nella vaschetta di incubazione.

2. Preparazione dell'inoculo:

- aprire una fiala di API NaCl 0,85% Medium (2 ml)
- servendosi di una pipetta, prelevare da 1 a 4 colonie di identica morfologia
- preparare una sospensione batterica di 0,5 McFarland.

3. Inoculo della galleria:

- con la sospensione preparata riempire le provette (ma non le cupole) dei test da NO₃ a PNPG servendosi della pipetta utilizzata per il prelievo
- aprire una fiala di API AUX Medium e trasferirvi circa 200 µl della sospensione precedente. Omogeneizzare con la pipetta, evitando la formazione di bolle.
- riempire le provette e le cupole dei test da GLU a PAC fino ad ottenere un menisco orizzontale o leggermente convesso, ma mai concavo
- riempire con olio di paraffina le cupole dei 3 test sottolineati (GLU, ADH e URE) per formare un menisco convesso
- richiudere la vaschetta di incubazione ed incubare a 29 ± 2 °C per 24 ore (± 2 ore).

API NH (bioMérieux)

API NH è un sistema standardizzato per l'identificazione di *Neisseria*, *Haemophilus* (e generi apparentati) e *Moraxella catarrhalis* (*Branhamella catarrhalis*) contenente dei test miniautizzati e una base dei dati. API NH

permette inoltre la biotipizzazione dei batteri *Haemophilus influenzae* ed *Haemophilus parainfluenzae*, nonché la ricerca delle penicillinasi.

La galleria API NH è composta da 10 microprovette contenenti substrati disidratati per l'esecuzione di 12 test d'identificazione (reazioni enzimatiche o attività fermentativa degli zuccheri), nonché per la ricerca delle penicillinasi (in particolare nelle specie *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Moraxella catarrhalis* "*Branhamella catarrhalis*" e *Neisseria gonorrhoeae*).

Procedimento

1. Preparazione della galleria:

- riunire fondo e coperchio di una vaschetta di incubazione
- annotare il riferimento del ceppo sulla linguetta laterale della vaschetta
- estrarre la galleria dalla confezione
- mettere la galleria nella vaschetta di incubazione
- eliminare il sacchetto disidratante.

2. Preparazione dell'inoculo:

- aprire una fiala di API NaCl 0,85% Medium (2 ml)
- servendosi di un tampone, prelevare più colonie ben isolate e preparare una sospensione batterica la cui torbidità sia pari allo standard 4 di McFarland, omogeneizzando accuratamente.

3. Inoculo della galleria:

- distribuire la sospensione batterica precedentemente preparata nelle cupole evitando la formazione delle bolle:
 - per i primi 7 test (da PEN a URE), riempire soltanto la parte della microprovetta trasferendovi circa 50 µl

- per gli ultimi 3 test: LIP/ProA, PAL/GGT e β GAL//IND,
riempire microprovetta e cupola trasferendovi circa 150 μ l
e cercando di evitare la formazione di un menisco convesso
- richiudere con il coperchio la vaschetta di incubazione
- incubare da 2 ore a 2 ore e 15 minuti a 36 ± 2 °C in atmosfera aerobia.

API Coryne (bioMérieux)

API Coryne è un sistema standardizzato per l'identificazione in 24 ore di batteri corineiformi che utilizza test miniaturizzati insieme ad una base dei dati specifica.

La galleria API Coryne è composta da 20 microprovette contenenti substrati disidratati per la rilevazione di attività enzimatiche o fermentazione degli zuccheri.

Procedimento

1. Preparazione della galleria:

- preparare una vaschetta di incubazione (fondo e coperchio) e distribuire circa 5 ml di acqua distillata nei pozzetti del fondo della vaschetta per creare un ambiente umido
- annotare il riferimento del ceppo sulla linguetta laterale della vaschetta
- estrarre la galleria dal suo involucro
- mettere la galleria nella vaschetta di incubazione.

2. Preparazione dell'inoculo:

- aprire una fiala di API Suspension Medium
- con l'aiuto di un tampone, preparare una sospensione di opacità superiore a quella del punto 6 di McFarland.

3. Inoculo della galleria:

- distribuire la sospensione preparata nei primmi undici test della galleria (da NIT a GEL), evitando la formazione di bolle:
 - per i test da NIT a ESC: distribuire circa 100–150 μ l in ogni cupola
 - per il test URE: riempire soltanto la microprovetta
 - per il test GEL: riempire microprovetta e cupola
- negli ultimi nove test della galleria (da 0 a GLYG):
 - aprire una fiala di API GP Medium e trasferirvi circa 0,5 ml della sospensione precedente. Omogeneizzare bene
 - distribuire questa nuova sospensione soltanto nelle microprovette
- riempire le cupole dei testi sottolineati (URE, da 0 a GLYG) con olio di parafina formando un menisco leggermente convesso
- chiudere la vaschetta di incubazione
- incubare per 24 ore (\pm 2 ore) a 36 ± 2 °C in aerobiosi.

rapid ID 32 A (bioMérieux)

rapid ID 32 A è un sistema standardizzato, per l'identificazione in 4 ore dei batteri anaerobi, costituito da 29 test enzimatici miniaturizzati e una base dei dati specifica.

La galleria rapid ID 32 A è composta da 32 cupole, di cui 29 sono utilizzate per i test e contengono un mezzo di reazione disidratato. La lettura delle reazioni si effettua dopo 4 ore di incubazione in aerobiosi, sia ad occhio nudo che utilizzando gli strumenti ATBTM ExpressionTM ou mini API (bioMérieux).

Procedimento

1. Preparazione della galleria:

- estrarre la galleria dal suo involucro
- gettare il sacchetto del disidratante
- mettere il coperchio
- annotare il riferimento del ceppo sulla linguetta laterale della galleria.

2. Preparazione dell'inoculo:

- aprire una fiala di API Suspension Medium (2 ml)
- prelevare una o più colonie identiche dal terreno di coltura
- preparare una sospensione batterica con una opacità pari al punto 4 di McFarland

3. Inoculo della galleria:

- inoculo automatico:
 - disporre su un vassoio dell'inoculatore ATB la galleria, la fiala di API Suspension Medium ed un puntale
 - l'inoculatore esegue automaticamente l'omogeneizzazione della fiala ed il riempimento delle cupole (55 μ l/cupola)
- inoculo manuale:
 - omogeneizzare la fiala API Suspension Medium inoculata e, servendosi della ATB Pipetta Elettronica ATB, distribuire 55 μ l di sospensione in ogni cupola della galleria
- coprire il test URE con due gocce di olio di paraffina (cupla 1.0)
- mettere il coperchio sulla galleria
- incubare a 36 ± 2 °C per 4–4 ore e 30 minuti in condizioni di aerobiosi.

ID 32 C (bioMérieux)

ID 32 C è un sistema per l'identificazione automatica dei lieviti, che utilizza 32 test di assimilazione standardizzati e miniaturizzati e una base dei dati specifica.

La galleria ID 32 C è composta da 32 cupole; ogni cupola contiene un substrato disidratato (carboidrato). Il lievito da identificare è messo in sospensione in un terreno semi-solido. La lettura delle reazioni si effettua dopo 24–48 ore di incubazione, sia ad occhio nudo che utilizzando gli strumenti ATBTM ExpressionTM ou mini API (bioMérieux).

Procedimento

1. Preparazione della galleria:

- estrarre la galleria dal suo involucro
- gettare il sacchetto del disidratante
- mettere il coperchio
- annotare il riferimento del ceppo sulla linguetta laterale della galleria.

2. Preparazione dell'inoculo:

- aprire una fiala di API Suspension Medium (2 ml)
- prelevare una o più colonie identiche dal terreno di coltura
- preparare una sospensione batterica con una opacità par al punto 2 di McFarland
- aprire una fiala di API C Medium e trasferirvi 250 µl della sospensione precedentemente preparata.

3. Inoculo della galleria:

- inoculo automatico:
 - disporre su un vassoio dell'inoculatore ATB la galleria, la fiala di API C Medium inoculata ed il puntale

- l'inoculatore eseguirà automaticamente l'omogeneizzazione della fiala ed il riempimento delle cupole (135 μ l/cupola)
- inoculo manuale:
 - omogeneizzare la fiala di API C Medium inoculata e, servendosi della ATB Pipetta Elettronica, distribuire 135 μ l di sospensione per ogni cupola
- mettere il coperchio sulla galleria
- incubare a 29 ± 2 °C per 24–48 ore.

Sistemi a codice numerico

L'identificazione dei batteri è stato facilitato dall'impiego dei sistemi automatizzato e a kit, per mezzo dei quali i microrganismi possono essere identificati mediante codici numerici computerizzati. Un codice numerico è un sistema mediante il quale diverse caratteristiche batteriche sono traslate in una sequenza di numeri che rappresentano una o più specie batteriche.

Le caratteristiche di identificazione dei microrganismi possono essere facilmente traslate in numerazione binaria assegnando il codice “1” alle reazioni positive ed il codice “0” alle reazioni negative. Questo approccio può essere illustrato usando la sequenza delle caratteristiche delle striscette API 20 E (bioMérieux) come punto di riferimento e convertendo le reazioni positive o negative in numeri binari (tab. 3.3).

Se i numeri binari mostrati nella tabella 3.3 sono letti dalla cima alla base e riarrangiati in modo orizzontale, si ottiene in numero binario:

101010000111111011100

Benché i computer siano costruiti per ricevere bit di dati 1/0 da cui calcolare risultati significativi, la mente umana non può manipolare con efficienza la logica binaria; così i codici binari devono essere convertiti in sistemi matematici semplici, per diventare utilizzabili. A questo proposito è stata applicata la conversione del sistema a due digitazioni (binario) ad

Tabella 3.3: Conversione binaria delle reazioni dei microrganismi sconosciuti sulle striscette di API 20 E (bioMérieux)

Caratteristica	Reazione	Conversione binaria
ONGP	+	1
Arginina	–	0
Lisina	+	1
Ornitina	–	0
Citrato	+	1
Idrogeno solfito	–	0
Ureasi	–	0
Tripofano deaminasi	–	0
Indolo	–	1
Voges-Proskauer	+	1
Gelatina	+	1
Glucosio	+	1
Mannitolo	+	1
Inositolo	+	1
Sorbitolo	+	1
Ramnosio	–	0
Sucrosio	+	1
Melibiosio	+	1
Amigdalina	+	1
Arabinosio	–	0
Ossidasi	–	0

Tabella 3.4: Conversione ottale del codice binario

Codice binario	Formula di conversione	Ottale
– – –	$0 + 0 + 0 =$	0
+ – –	$1 + 0 + 0 =$	1
– + –	$0 + 2 + 0 =$	2
+ + –	$1 + 2 + 0 =$	3
– – +	$0 + 0 + 4 =$	4
+ – +	$1 + 0 + 4 =$	5
– + +	$0 + 2 + 4 =$	6
+ + +	$1 + 2 + 4 =$	7

un sistema ad otto digitazioni (ottale), ciascuna delle quali rappresenta uno degli otto numeri, che vanno da 0 a 7.

Iniziando da destra dividere i numeri binari in insiemi di tre numeri:

101 010 000 111 111 011 100

Ora convertire ciascuno dei tre insiemi di numeri in equivalenti ottali, usando la formula riportata nella tabella 3.4.

101 010 000 111 111 011 100
5207761

Il numero 5207761 è facile da ricordare e più semplice da scrivere in un computer, rispetto al numero binario 10101000011111011100.

Questi derivati ottali sono conosciuti come **numero biotipo**, cioè una rappresentazione numerica di una serie di espressioni fenotipiche caratteristiche e tipiche di quel dato microrganismo. Ciascuno numero del sistema ottale corrisponde a tre caratteristiche biochimiche e che i numeri di per sé rappresentano un pattern di reazioni positive e negative.

Lettura di codici ottali in registri a codice numerico

Tutte le ditte produttrici che hanno fabbricato i kit di identificazione e li hanno portati sul mercato, pubblicano i registri dei codici numerici in cui sono contenuti centinaia di numeri di biotipo caratterizzati da una o più specie batteriche che sono specifiche per quel numero. Per esempio, per il numero di biotipo 5207761, derivante dal set di reazioni dell'API 20 E (bioMérieux) utilizzato come esempio precedente, con un'identificazione accettabile è eleganta *Serratia marcescens*.

3.1.32 Sistema Vitek 2 (bioMérieux)

VITEK2 è un sistema completamente automatizzato, integra in un solo strumento le fasi di preparazione, incubazione e lettura per i test dell'identificazione (ID) e dell'antibiogramma (AST) nei laboratori clinici.



Le card VITEK 2 per l'identificazione e l'antibiogramma includono 64 pozzetti contenenti reagenti biochimici o antibiotici. Nella card è pre-inserito il tubicino di trasferimento della sospensione del microrganismo e un'etichetta con codice a barre che permette il collegamento tra card e numero di riferimento del paziente.

I risultati per l'identificazione sono assicurati da substrati fluorescenti inseriti nella card. VITEK 2 AST utilizza una tecnologia turbidimetrica.

Una volta standardizzata la sospensione del microrganismo a 0,5 McFarland, i passi successivi da compiere nei processi di inoculazione, incubazione e lettura sono completamente controllati e guidati dallo strumento e dal software del computer. Una volta che il ciclo del test è completato, la card VITEK 2 viene automaticamente eliminata in un apposito contenitore di rifiuti. La struttura interna del VITEK 2 consiste in diverse stazioni di processo del campione ed in un lettore/incubatore.

Le card VITEK 2 e le provette vengono caricate nelle cassette SCS dall'utente. Le informazioni del paziente vengono memorizzate mediante il lettore del codice a barre SCS e trasferite allo strumento tramite un microchip contenuto nella cassetta.

Le cassette dal SCS vengono inserite nel carrello trasportatore dello strumento e condotte alle diverse stazioni. Dopo essere state riempite e sigillate, vengono automaticamente inserite nell'incubatore. Completato l'intero processo le card sono automaticamente eliminate in un apposito contenitore. Lo spazio nell'incubatore è allora libero e può essere usato per nuove cards.

3.2 Esame parassitologico

3.2.1 Parassiti intestinali

I campioni fecali vengono esaminati per la ricerca di protozoi e di elminti.

Le forme di protozoi riscontrabili nelle feci sono trofozoiti e cisti. Quelle di elminti, in genere, sono larve e uova e, più raramente, vermi adulti (ad esempio *Enterobius vermicularis* o *Ascaris lumbricoides*) o loro segmenti (ad esempio proglottidi di *Taenia* spp.).

Nelle indagini epidemiologiche è, in genere, sufficiente esaminare un solo campione, ma nella pratica diagnostica è d'obbligo esaminare almeno tre campioni (a volte anche più), raccolti a giorni alterni.

- Esaminare a occhio nudo le feci appena giungono in laboratorio e registrarne la consistenza.
- Osservare la presenza eventuale di muco e/o sangue¹⁰.
- Escludere o valutare la presenza di eventuali parassiti macroscopicamente rilevabili (elminti o parte di essi).
- Allestire un preparato microscopico diretto “a fresco” miscelando le feci con soluzione fisiologica (1:1) e osservare a 100 e 400 ingrandimenti.

Esame microscopico delle feci dopo concentrazione

I metodi di concentrazione permettono di evidenziare forme diagnostiche presenti in numero così esiguo da sfuggire all'esame diretto. La concentrazione può essere ottenuta per flottazione o per sedimentazione.

I metodi di sedimentazione permettono di concentrare praticamente quasi tutte le forme diagnostiche di interesse medico, incluse le uova d'elminti ad elevato peso specifico che non affiorano per flottazione.

¹⁰Se si ricevono contemporaneamente parecchi campioni, devono essere esaminati per primi quelli contenenti muco e/o sangue, quindi quelli acquosi e diarroici, lasciando per ultimi i campioni soffici e formati.

La concentrazione con formalina-etere/etilacetato è, tra le tecniche di sedimentazione, quella di elezione [21]. È effettuata a partire da un campione fissato in formalina 10% (1:3), per almeno 30 minuti:

1. Filtrare 5–7 ml di campione in una provetta di polipropilene da 15 ml.
2. Aggiungere 3 ml di acetato di etile (o etere etilico).
3. Miscelare per inversione.
4. Centrifugare a 2.000 giri/minuto per 4 minuti. Al termine della centrifugazione si formeranno 4 strati (dall'alto verso il basso: solvente, detriti fecali, formalina, sedimento).
5. Eliminare le 3 fasi superiori.
6. Pulire le pareti della provetta con un tampone di cotone.
7. Risospendere il sedimento in soluzione fisiologica (1:1).
8. Depositare una goccia della sospensione al centro di un vetrino portaoggetto e coprire con un vetrino coprioggetto.
9. Osservare al microscopio ottico calibrato (10× e poi 40×).

Protozoi

Tabella 3.5: Classificazione dei protozoi intestinali di interesse umano

<u>Amebe</u>	<u>Flagellati</u>
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Entamoeba histolytica</i> • <i>Entamoeba dispar</i> • <i>Entamoeba hartmanni</i> • <i>Entamoeba coli</i> • <i>Entamoeba polecki</i> • <i>Endolimax nana</i> • <i>Iodamoeba buetschilii</i> • <i>Blastocystis hominis</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Giardia intestinalis</i> (<i>G. lamblia</i>) • <i>Chilomastix mesnili</i> • <i>Dientamoeba fragilis</i> • <i>Trichomonas hominis</i> • <i>Enteromonas hominis</i> • <i>Retortamonas intestinalis</i>
<u>Ciliati</u>	<u>Coccidi (sporozoi)</u>
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Balantidium coli</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Cryptosporidium parvum</i>
<u>Microsporidi</u>	
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Enterocytozoon bieneusi</i> • <i>Encephalitozoon intestinalis</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Cyclospora cayetamensis</i> • <i>Isospora belli</i> • <i>Sarcocystis hominis</i> • <i>Sarcocystis suihominis</i> • <i>Sarcocystis lindemanni</i>

Ai protozoi intestinali appartengono, come schematizzato nella tabella 3.5, amebe, flagellati, ciliati, coccidi e microsporidi.

Tra le amebe, soltanto *Entamoeba histolytica* (fig. 3.15 e 3.16) è potenzialmente patogena.

Tra i flagellati, solo *Giardia intestinalis* (fig. 3.17 e 3.18) e *Dientamoeba fragilis* sono patogeni.

Tra i ciliati, solo *Balantidium coli*, oggi assai raro, interessa l'uomo ed è patogeno.

Tra i coccidi, la gravità dell'infezione è spesso strettamente correlata allo stato immunitario del paziente.

I microsporidi hanno importanza essenzialmente, se non esclusivamente, nel paziente immunodepresso grave.

Per quanto riguarda amebe e flagellati, nelle feci si possono ritrovare sia trofozoiti che cisti. I trofozoiti sono presenti, in genere, nelle feci diarroiche liquide o semiliquide, le cisti in quelle formate o semiformate. Comunque le due forme possono riscontrarsi nel medesimo campione. L'esame microscopico diretto "a fresco" permette la visualizzazione della mobilità dei trofozoiti, utile soprattutto nella diagnosi di infezione da amebe patogene.

Identificazione dei trofozoiti amebici

1. Preparati con soluzione fisiologica:

Nei preparati con soluzione fisiologica i trofozoiti di amebe possono essere osservati e riconosciuti solo in feci appena emesse. A 400 ingrandimenti si possono evidenziare sia il tipo di movimento sia le eventuali varie inclusioni (emazie, lieviti, batteri ecc.). Con questo tipo di preparati il nucleo non è chiaramente visibile (tranne per *Entamoeba coli*).

Mentre i trofozoiti di *Entamoeba coli* emettono pseudopodi in tutte le direzioni e hanno movimenti "torpidi" senza mostrare una chiara direzione di traslazione, i trofozoiti di *Entamoeba histolytica/dispar* hanno un movimento "rapido" unidirezionale (nei preparati "a fresco" i trofozoiti perdono rapidamente di vitalità per cui possono restare quasi immobili anche per più minuti prima di emettere pseudopodi).

Attualmente è riconosciuta l'esistenza di due specie distinte e morfologicamente indistinguibili, *Entamoeba histolytica* patogena e *Entamoeba dispar* non patogena. Per l'identificazione si deve ricorrere

re alle colture specifiche, alla tipizzazione mediante zimodemi o a tecniche immunoenzimatiche o di biologia molecolare [22, 23].

Il solo caso in cui è possibile la diagnosi diretta di *Entamoeba histolytica* (fig. 3.15) si verifica quando nel campione sono presenti trofozoiti contenenti emazie, segno di invasività del protozoo.

Mobilità unidirezionale veloce + emazie ingerite = *Entamoeba histolytica*

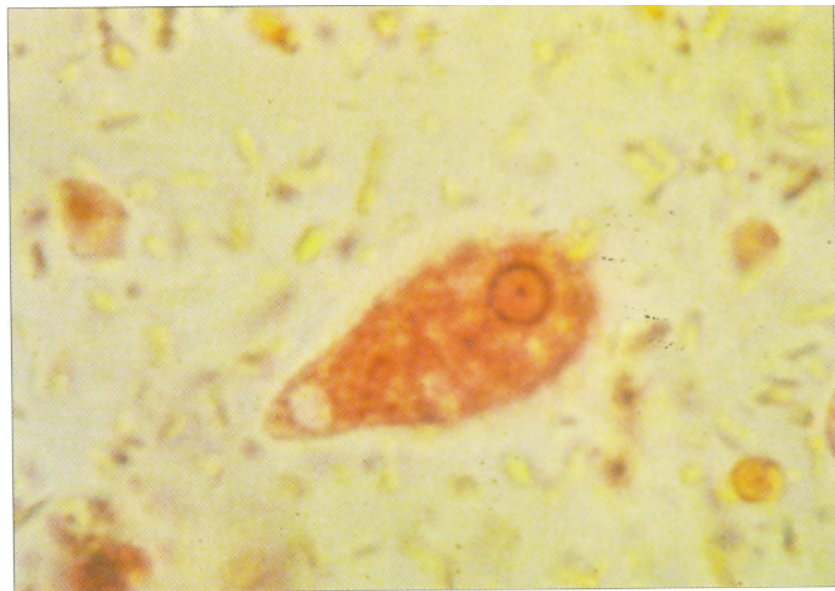


Figura 3.15: *Entamoeba histolytica*: trofozoite con emazie fagocitate



Figura 3.16: *Entamoeba histolytica/dispar*: cisti mononucleata

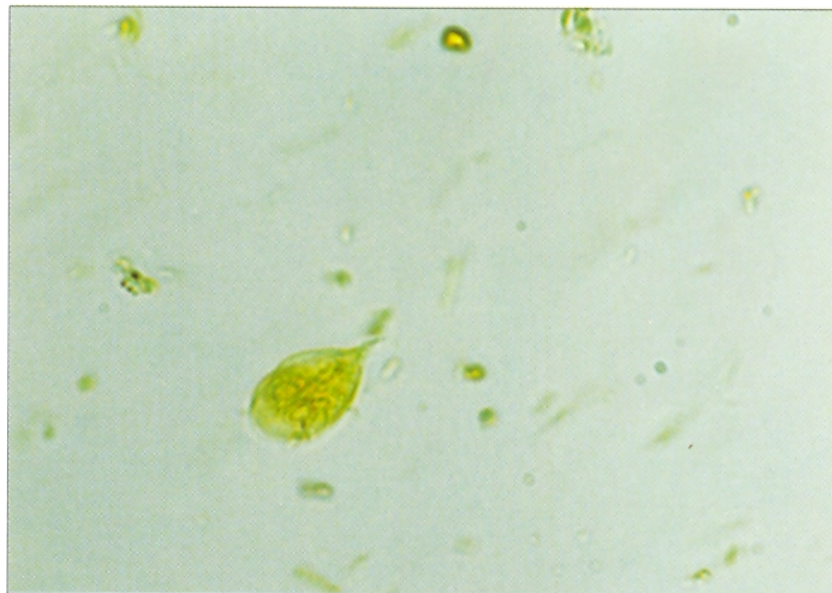


Figura 3.17: *Giardia intestinalis*: trofozoite



Figura 3.18: *Giardia intestinalis*: cisti

Elminti

Tabella 3.6: Classificazione degli elminti intestinali di interesse umano

<u>Nematodi</u>	<u>Cestodi</u>
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Ascaris lumbricoides</i> • <i>Enterobius vermicularis</i> • <i>Ancylostoma duodenale</i> • <i>Necator americanus</i> • <i>Strongyloides stercoralis</i> • <i>Strongyloides fuelleborni</i> • <i>Trichostrongylus</i> spp. • <i>Capillaria philippinensis</i> • <i>Trichuris trichiura</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Diphyllobothrium latum</i> • <i>Dipylidium caninum</i> • <i>Hymenolepis nana</i> • <i>Hymenolepis diminuta</i> • <i>Taenia solium</i> • <i>Taenia saginata</i>
<u>Trematodi</u>	
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Dicrocoelium dendriticum</i> • <i>Fasciolopsis buski</i> • <i>Echinostoma ilocanum</i> • <i>Heterophyes heterophyes</i> • <i>Metagonimus yokogawai</i> 	

Gli elminti intestinali sono rappresentati da specie appartenenti ai 3 gruppi distinti riportati nella tabella 3.6: nematodi, cestodi, trematodi.

Le forme diagnostiche di elminti vengono, in diversa misura e con diversa modalità, escrete con le feci e si evidenziano quindi attraverso l'esame macro e microscopico.

Tra i nematodi, le uova di ossiuro sono evidenziate, dopo concentrazione, in meno del 5% dei casi. La femmina gravida di *Enterobius vermicularis*, durante le ore notturne, migra fino all'apertura anale dell'ospite, dove depone le uova che aderiscono alla mucosa ed alla cute. Tali uova vanno quindi ricercate a livello della cute perianale, attraverso la tecnica nota come test di Graham o Scotch test.

Test di Graham (Scotch test)

Il prelievo deve essere effettuato al mattino, prima che il paziente defechi e/o si lavi.

Esecuzione:

1. Tagliare con le forbici un pezzetto di nastro adesivo di lunghezza di un vetrino portaoggetti
2. Porre il nastro adesivo sull'estremità di un abbassalingua avendo cura che la parte gommata sia posizionata all'esterno
3. Tenere ben fermo il nastro adesivo sull'abbassalingua
4. Premere la parte gommata del nastro adesivo contro diverse aree della regione perianale
5. Applicare il nastro adesivo sul vetrino. Utilizzando una garza o un batuffolo di cotone premere delicatamente in modo da fare ben aderire il nastro sul vetrino
6. Esaminare il preparato utilizzando l'obiettivo a 10×.

Così come per la ricerca dei parassiti nelle feci, anche per lo Scotch test è vivamente consigliato un esame seriato su 3–4 campioni consecutivi, infatti un singolo Scotch test individua solo il 60% delle infestazioni. Lo Scotch test può evidenziare anche uova o embrioforesi di *Taenia* spp.

Diagnosi di schistosomiasi urinaria

I campioni urinari vengono analizzati per la ricerca di uova di *Schistosoma haematobium*.

Nelle aree in cui la schistosomiasi da *Schistosoma haematobium* è endemica, la prima evidenza indiretta di infezione è l'ematuria e/o la proteinuria. Ematuria massiva può essere indice di infezione grave.

Il numero delle uova nelle urine varia durante la giornata ed è più elevato nelle urine tra le ore 10 e le ore 14. I campioni dovrebbero essere raccolti in questo intervallo di tempo (in genere attorno alle ore 12) ed essere costituiti da almeno 10 ml di urine del mitto terminale.

Le urine vanno raccolte in un contenitore pulito, conservate al buio ed esaminate entro un'ora. Se ciò non fosse possibile, aggiungere 1 ml di formalina non diluita (soluzione di formaldeide al 37–40%) o 2 ml di ipoclorito di sodio (candeggina) e mescolare.

In alternativa, si può ricorrere alla raccolta dei mitti terminali di ogni minzione nell'arco delle 24 ore. Anche in questo caso è necessario aggiungere alle urine il conservante.

La ricerca deve essere effettuata sull'intero campione, in quanto le uova possono essere in scarso numero.

I metodi utilizzati per la ricerca delle uova sono la filtrazione e la sedimentazione. Nonostante la sedimentazione sia meno sensibile della filtrazione, per semplicità tecnica e rapidità, essa risulta essere la più utilizzata nella routine di laboratorio:

1. Agitare bene il campione di urine e trasferire 10 ml in una provetta a fondo conico
2. Centrifugare a 1.500–2.000 giri/minuto per 2 minuti
3. Con una pipetta Pasteur eliminare il sopranatante e trasferire l'intero sedimento su di un vetrino portaoggetti; coprirlo con un vetrino coprioggetti ed esaminare tutto il vetrino con obiettivo 10×.



Figura 3.19: Uovo di *Schistosoma mansoni*



Figura 3.20: Uovo di *Schistosoma haematobium*



Figura 3.21: Uova larvate di *Enterobius vermicularis*

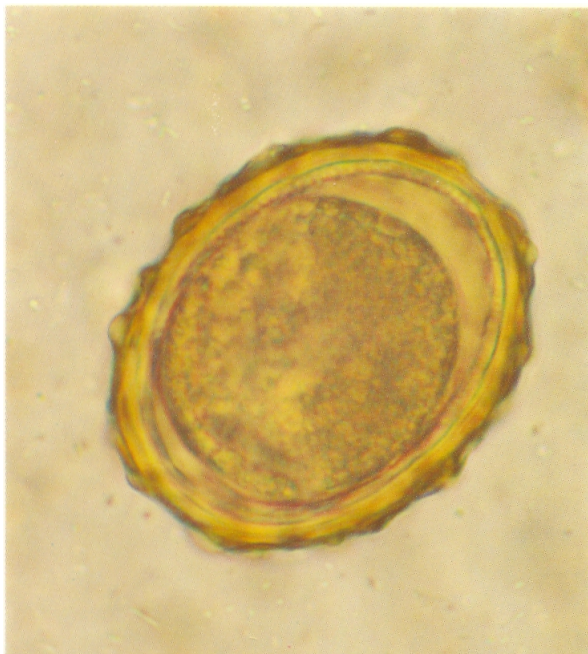


Figura 3.22: Uovo di *Ascaris lumbricoides*



Figura 3.23: Uova di *Taenia* spp.

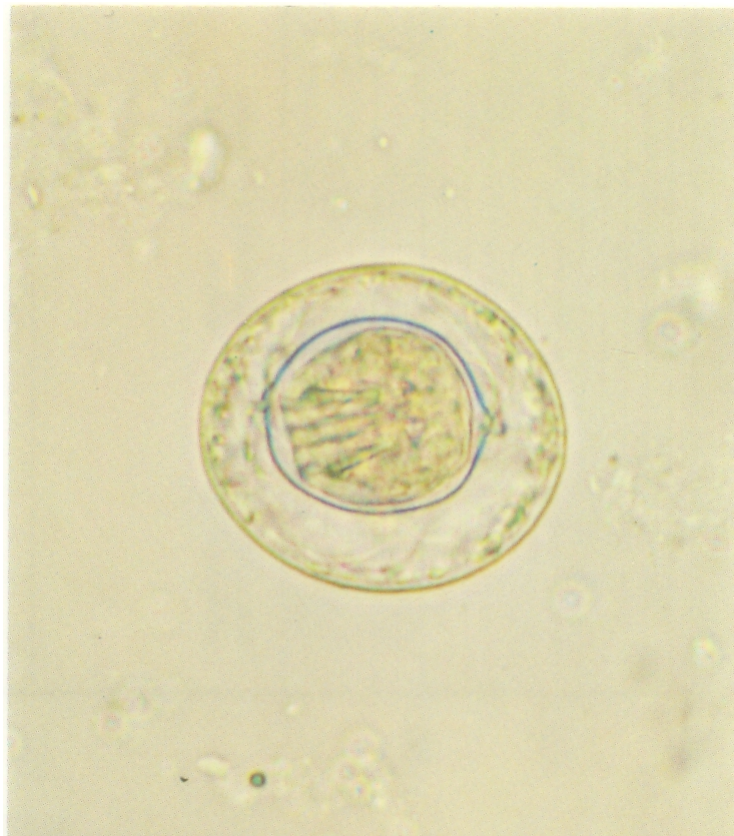


Figura 3.24: Uovo di *Hymenolepis nana*

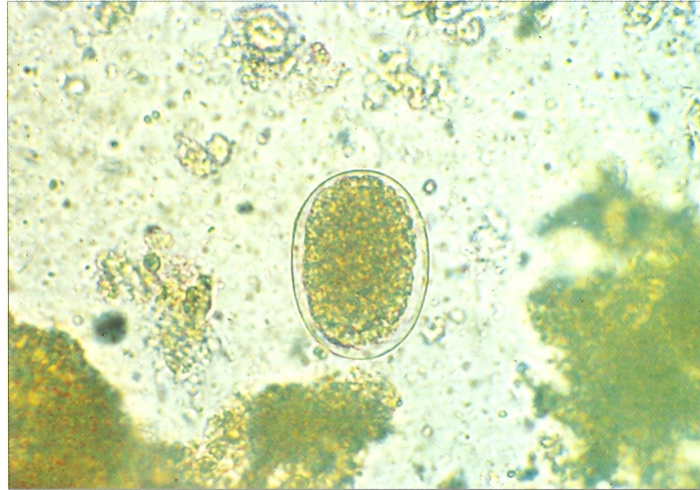


Figura 3.25: Uovo di *Ancylostoma duodenale*



Figura 3.26: Larva di *Strongyloides stercoralis*

3.2.2 Parassiti ematici

Protozoi

Tabella 3.7: Classificazione dei protozoi ematici e/o tissutali di interesse umano

<u>Sporozoi ematici</u>	<u>Flagellati ematici e/o tissutali</u>
<ul style="list-style-type: none">• <i>Plasmodium vivax</i>• <i>Plasmodium ovale</i>• <i>Plasmodium malariae</i>• <i>Plasmodium falciparum</i>• <i>Babesia</i> spp.	<ul style="list-style-type: none">• <i>Leishmania</i> spp.• <i>Trypanosoma brucei gambiense</i>• <i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i>• <i>Trypanosoma cruzi</i>• <i>Trypanosoma rangeli</i>

Diagnosi di infezione malarica

La diagnosi della malaria, a tutt'oggi, è basata sulla ricerca del parassita malarico (il plasmodio, nei suoi vari stadi evolutivi) con esame microscopico dello striscio di sangue periferico e della goccia spessa.

Allestimento dei preparati

È sempre opportuno allestire almeno 5–6 vetrini con striscio sottile e 2–3 con goccia spessa.

Prelievo

1. Il prelievo di sangue va preferibilmente effettuato dal terzo dito della mano, che in genere presenta un'epidermide meno spessa. Dopo aver disinfettato e sgrassato con alcool, asciugare bene con una

garza e stringere fortemente il dito alcune volte per stimolare la circolazione sanguigna

2. Con una lancetta sterile pungere il polpastrello. Raccogliere la prima goccia di sangue direttamente al centro di un vetrino portaoggetti.

Striscio sottile

1. Strisciare la goccia di sangue sul vetrino utilizzando il bordo di un secondo vetrino tenuto inclinato in modo da formare un angolo di 45° circa
2. Lasciare asciugare il vetrino a temperatura ambiente.

Colorazione dello striscio sottile con May Grunwald-Giemsa

1. Coprire lo striscio ematico con il colorante May Grunwald. Lasciare agire per un minuto e successivamente aggiungere un uguale volume di acqua distillata. Miscelare con attenzione facendo ruotare il vetrino
2. Lasciare agire il colorante diluito per un minuto e infine eliminare l'eccesso di colorante senza risciacquare
3. Coprire il vetrino con una miscela preparata diluendo 10–20 gocce di colorante Giemsa diluito in 10 ml di acqua distillata. Il colorante va diluito ogni volta al momento dell'uso
4. Colorare per 10–15 minuti. Lavare per circa 5 secondi con acqua distillata
5. Lasciare all'aria e osservare il vetrino con obiettivo ad immersione.

Indice di parassitemia

In caso di positività è necessario valutare il grado della parassitemia. Si suggerisce questo semplice metodo: contare il numero di eritrociti parassitati e riportare il percentuale.

Valori di parassitemia superiore al 5% indicano infezioni gravi.

Identificazione di specie

La diagnosi di specie si effettua esaminando nello striscio sottile sia la morfologia degli eritrociti parassitati sia quella dei parassiti.

Degli eritrociti occorre osservare:

- le dimensioni e la forma
- la presenza o meno di granulazioni.

Per quanto riguarda invece i parassiti vanno ricercate le seguenti caratteristiche:

- forma e disposizione dei trofozoiti
- colore e quantità del pigmento contenuto nei trofozoiti maturi, negli schizonti e nei gametociti
- numero dei merozoiti negli schizonti maturi
- forma dei gametociti
- presenza contemporanea di diversi stadi di maturazione del parassita.

Goccia spessa

1. Depositare sul vetrino una goccia di sangue di almeno 10–20 μl ; la goccia deve essere allargata su una superficie di circa 1 cm^2 con movimenti circolari centrifughi utilizzando un'ansina da batteriologia o un angolo di un altro vetrino. Tali movimenti permetteranno la contemporanea defibrinizzazione del sangue nel caso di utilizzo di un campione non conservato in EDTA.

La goccia spessa, lasciata asciugare all'aria, non deve essere fissata; l'emolisi avverrà durante la colorazione.

Colorazione della goccia spessa con Giemsa

1. Immergere i vetrini in una vaschetta per colorazioni contenente la soluzione di Giemsa al 10% per 15–20 minuti
2. Lavare i vetrini immergendoli in una vaschetta contenente acqua di fonte, per alcuni secondi. Il lavaggio della goccia spessa deve essere particolarmente delicato
3. Porre i vetrini ad asciugare tenendoli in posizione verticale e osservare con obiettivo ad immersione

Vantaggi della goccia spessa rispetto allo striscio sottile:

- permette l'osservazione di una maggiore quantità di sangue
- tempi ridotti di osservazione

Svantaggi della goccia spessa rispetto allo striscio sottile:

- deve asciugare molto bene prima di essere colorata (12–24 ore)
- lettura difficoltosa per occhi non esperti
- non permette l'identificazione di specie


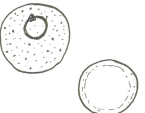














	<i>P. vivax</i>	<i>P. ovale</i>	<i>P. malariae</i>	<i>P. falciparum</i>
TROFOZOITE GIOVANE				
TROFOZOITE ADULTO				
SCHIZONTE MATURO				
GAMETOCITI				

Figura 3.27: Caratteristiche morfologiche dei parassiti malarici in strisci ematici sottili

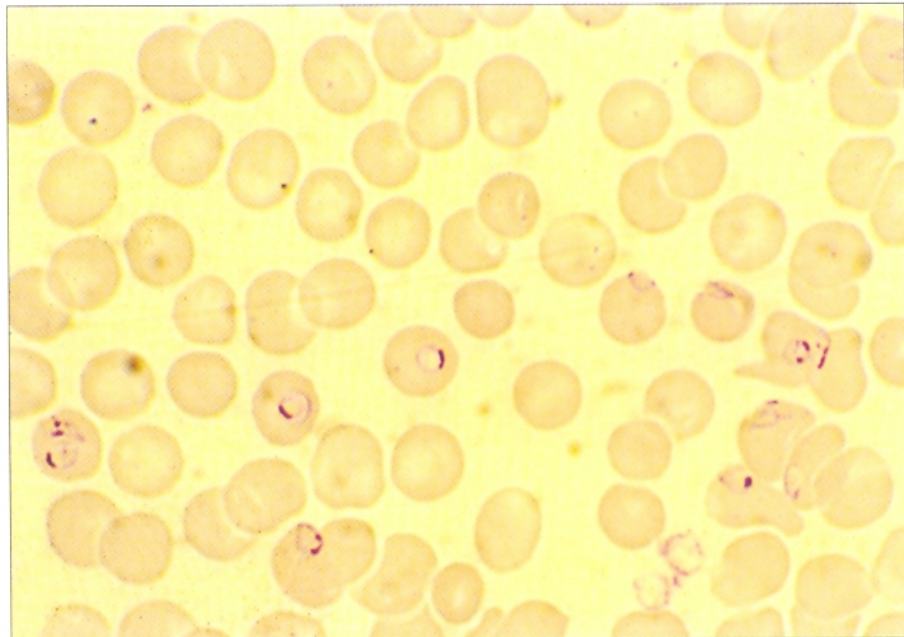


Figura 3.28: Striscio sottile Giemsa 1000×. *Plasmodium falciparum*: trofozoi



Figura 3.29: Striscio sottile Giemsa 1000×. *Plasmodium falciparum*: gametociti

Diagnosi di tripanosomiasi

La diagnosi di tripanosomiasi è effettuata mediante ricerca ematica diretta o colorazione di strisci ematici. *Trypanosoma brucei gambiense* e *Trypanosoma brucei rhodesiense*, le specie diffuse in Africa (il primo in Africa occidentale ed il secondo in Africa centrale, ma con alcune aree in cui possono essere presenti entrambi) ed agenti eziologici della “malattia del sonno”, sono tra loro morfologicamente indistinguibili.

Prelievo

Vedi paragrafo “Prelievo”, pag. 133.

Ricerca diretta

La ricerca diretta è il metodo più semplice e veloce per dimostrare la presenza di parassiti nel sangue.

Esecuzione:

1. Aggiungere alla goccia di sangue depositata sul vetrino portaoggetto una uguale quantità di soluzione fisiologica. Miscelare bene usando l'angolo di un vetrino coprioggetti
2. Coprire il preparato con il vetrino coprioggetti ed esaminare al microscopio a 100 ingrandimenti. Il primo segno della presenza di tripanosomi vivi è un rapido movimento visibile tra gli eritrociti. Confermare la presenza dei parassiti con obiettivo a 40×.

Colorazione di strisci ematici

Le colorazioni utilizzate per la ricerca di *Trypanosma* sono quelle di May-Grunwald-Giemsa, per strisci sottili, e di Giemsa, per gocce spesse (pag. 134 e pag. 136).

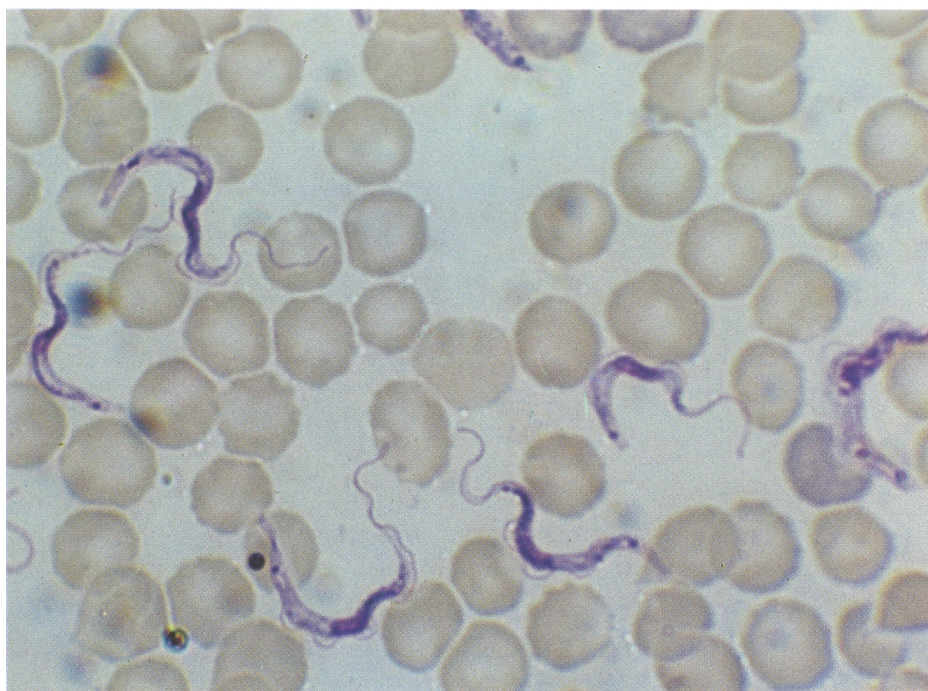


Figura 3.30: Tripomastigoti di *Trypanosoma brucei gambiense/rhodesiense*.

Elminti

Tabella 3.8: Classificazione degli elminti ematici e/o tissutali

<u>Nematodi (ematici e tissutali)</u>	<u>Nematodi (tissutali)</u>
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Wuchereria bancrofti</i> • <i>Brugia malayi</i> • <i>Brugia timori</i> • <i>Loa loa</i> • <i>Onchocerca volvulus</i> • <i>Mansonella ozzardi</i> • <i>Mansonella streptocerca</i> • <i>Mansonella perstans</i> • <i>Dirofilaria</i> spp. 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Trichinella</i> spp. • <i>Toxocara canis</i> • <i>Toxocara cati</i> • <i>Ancylostoma braziliensis</i> • <i>Ancylostoma caninum</i> • <i>Dracunculus medinensis</i> • <i>Angiostrongylus</i> spp. • <i>Capillaria hepatica</i> • <i>Gnathostoma spinigerum</i> • <i>Anisakis</i> spp.
<u>Cestodi (tissutali)</u>	<u>Trematodi (ematici)</u>
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Taenia solium</i> • <i>Echinococcus granulosus</i> • <i>Echinococcus multilocularis</i> • <i>Multiceps multiceps</i> • <i>Spirometra mansonoides</i> • <i>Diphyllobothrium</i> spp. 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Schistosoma mansoni</i> • <i>Schistosoma haematobium</i> • <i>Schistosoma intercalatum</i> • <i>Schistosoma japonicum</i> • <i>Schistosoma mekongi</i>

Diagnosi di infezione da filarie

Delle oltre 200 specie di filarie conosciute solo poche possono infettare l'uomo. Le filariosi che riguardano il continente africano sono causate nella maggioranza dei casi da *Loa loa* e da *Wuchereria bancrofti*. Sebbene le microfilarie si trovino nel sangue, gli adulti si localizzano in varie parti dell'organismo a seconda della specie:

- *Wuchereria bancrofti* linfonodi e vasi sanguigni
- *Brugia malayi* linfonodi e vasi sanguigni
- *Brugia timori* linfonodi e vasi sanguigni
- *Loa loa* tessuti sottocutaneo e sottocongiuntivale
- *Mansonella perstans* cavità pleurica, pericardica e peritoneale
- *Mansonella ozzardi* tessuti mesenterici e sottoperitoneali

Con l'eccezione di *Mansonella* spp., il numero delle microfilarie generate nel sangue aumenta durante le ore della nutrizione dell'insetto vettore. A causa di ciò è difficile trovare le microfilarie al di fuori di queste ore. Questo fenomeno è noto come periodicità. Possiamo avere una periodicità notturna (es. *Wuchereria bancrofti*) o diurna (es. *Loa loa*).

Prelievo dei campioni

Devono essere prelevati almeno 2 campioni di sangue: uno diurno (circa alle ore 13:00) ed un notturno (circa alle ore 24). Ciò è utile anche per diagnosticare eventuali infezioni miste. I campioni vanno esaminati immediatamente dopo il prelievo. Se ciò non fosse possibile, questi devono essere conservati a temperatura ambiente fino al momento dell'esame.

Ricerca delle microfilarie

Esistono quattro metodi per la ricerca delle microfilarie nel sangue:

1. Ricerca diretta: viene eseguita su sangue capillare

2. Ricerca dopo centrifugazione: viene eseguita su sangue venoso dopo emolisi
3. Ricerca con il metodo del microematocrito
4. Ricerca dopo filtrazione.

La ricerca diretta è il metodo più semplice e veloce (vedi paragrafo “Ricerca diretta”, pag. 139).

Identificazione di specie

L'identificazione delle microfilarie si basa sull'osservazione microscopica (May Grunwald-Giemsa su striscio sottile: pag. 134) delle caratteristiche sotto riportate:

1. Le dimensioni della microfilaria
 - lunghezza
 - spessore.
 2. La guaina
 - presente
 - assente.
- A volte, è una caratteristica di difficile osservazione.
3. L'estremità caudale e i nuclei in esso contenuti
 - estremità caudale appuntita o arrotondata
 - tratto terminale privo di nuclei o presenza di nuclei praticamente fino al termine dell'estremità caudale.
 4. I nuclei del corpo sono di colore viola intenso
 - ben separati “a ciottolato”
 - accavallati l'un l'altro, densamente stipati.

5. I “corpi di Manson” (l’abbozzo genitale)

- presenti, bene o meno bene visibili
- non visibili.

6. Le curvature della microfilaria nell’ambito della sua lunghezza

- curvature ampie
- curvature piccole e numerose



Figura 3.31: Striscio sottile Giemsa 1000×. *Loa loa*: Microfilaria

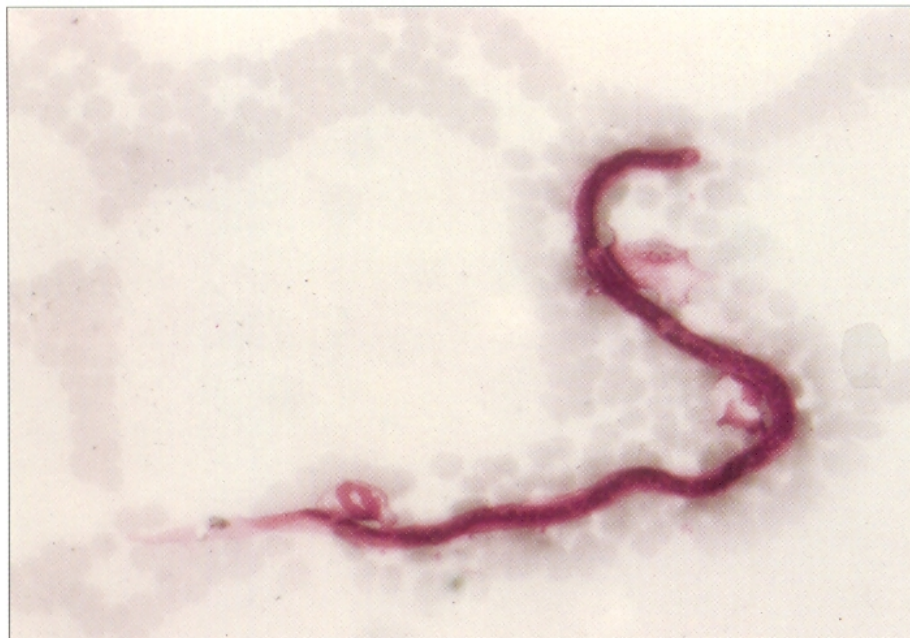


Figura 3.32: Striscio sottile Giemsa 1000×. *Wuchereria bancrofti*:
Microfilaria

Capitolo 4

RISULTATI

4.1 Esame batteriologico

Sono stati esaminati 5.400 campioni biologici pervenuti all'U.O. di Microbiologia Universitaria del Presidio Ospedaliero di Cisanello, nel periodo da dicembre 2010 a luglio 2011.

Dopo 24 ore di incubazione a 37 °C in termostato, le piastre venivano osservate e, se presenti germi da identificare, sottoposte alla fase successiva di identificazione e antibiogramma, altrimenti, le piastre venivano reincubate per ulteriori 24 ore. Facevano eccezione i campioni urinari e dei cateteri che dopo la prima lettura, anche presentando una scarsa crescita delle colonie non andavano reincubati, ma o sottoposti allo step successivo o refertati come negativi.

4.1.1 Lettura delle piastre

Durante l'operazione della lettura delle piastre (vedi paragrafo 3.1.19), tutti i campioni sono stati esaminati per discriminare la presenza di microrganismi patogeni, nei campioni da distretti con flora microbica normale. Per i campioni: urine, bile, broncospirato, broncolavaggio, sperma, catetere vescicale, catetere venoso centrale e liquidi di drenaggio, è stata data anche la conta semiquantitativa dei microrganismi patogeni.

Tutte le colture dovevano essere monomicrobiche per passare alla fase successiva; quelle che presentavano più specie batteriche, venivano sottoposte a subcolture (vedi paragrafo 3.1.20).

Bile, drenaggio e catetere

291 campioni di bile, 227 campioni da drenaggio, 296 di cateteri e 210 cateteri vescicali, sono stati esaminati per la ricerca di batteri, sia Gram positivi che Gram negativi e miceti.

Per i campioni di bile, catetere venoso centrale e catetere vescicale, veniva data anche la carica batterica:

1 colonia su piastra corrisponde a 10^2 CFU/ml, per il campione di bile

1 colonia su piastra corrisponde a 500 CFU/ml, per il catetere venoso centrale ed il catetere vescicale.

Broncoaspirato, broncolavaggio ed espettorato

Sono stati esaminati 264 campioni di broncoaspirato, 236 di broncolavaggio e 306 di espettorato per la ricerca di:

- *Streptococcus pneumoniae*
- *Haemophilus influenzae*
- *Staphylococcus aureus*
- *Klebsiella pneumoniae* e altre *Enterobacteriaceae*
- *Moraxella catarrhalis*
- *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella melaninogenicus* e altri anaerobi
- *Bordetella* spp.
- miceti
- e, in generale, di qualsiasi microrganismo possa essere considerato patogeno e non un contaminante.

Per i campioni: broncoaspirato e broncolavaggio, veniva data anche la carica batterica:

1 colonia su piastra corrisponde a 10^4 CFU/ml del campione originale.

Emocolture e liquido pleurico

366 emocolture e 289 campioni di liquido pleurico sono stati esaminati per la ricerca di batteri, sia Gram positivi che Gram negativi e miceti.

Feci (coprocoltura)

324 coprocolture sono state esaminate per ricerca di:

- *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter* spp.
- *Salmonella* spp.
- *Shigella* spp.
- *Yersinia* spp.
- miceti.

Sperma

103 campioni di sperma sono stati esaminati per la ricerca di batteri e miceti.

Per i campioni di sperma, veniva data anche la carica batterica:

1 colonia su piastra corrisponde a 100 CFU/ml

Tampone ascellare, inguinale e cutaneo

287 campioni di tampone ascellare, 175 di tampone inguinale e 250 campioni di tampone cutaneo, sono stati esaminati per la ricerca di:

- *Staphylococcus aureus*
- *Streptococcus pyogenes*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- miceti
- ed eventuali altri germi patogeni.

Tampone auricolare

227 campioni di tampone auricolare sono stati esaminati per la ricerca di:

- *Streptococcus pneumoniae* e altri streptococchi
- *Haemophilus influenzae*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Staphylococcus aureus*
- *Proteus* spp.
- batteri anaerobi
- miceti
- ed eventuali altri germi patogeni.

Tampone faringeo

Sono stati esaminati 300 campioni di tampone faringeo per la ricerca di germi patogeni e miceti; in particolare:

- *Streptococcus pyogenes*
- *Staphylococcus aureus*
- miceti.

Tampone ferita

239 campioni di tamponi di ferita sono stati esaminati per la ricerca di:

- *Staphylococcus aureus*
- *Streptococcus pyogenes*
- *Clostridium* spp., *Bacteroides* spp. e altri batteri anaerobio

- *Enterobacteriaceae*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Enterococcus* spp.
- miceti.

Tampone nasale

120 campioni di tampone nasale sono stati esaminati per la ricerca di:

- *Streptococcus pneumoniae*
- *Streptococcus pyogenes*
- *Staphylococcus aureus*
- *Klebsiella* spp. e altre *Enterobacteriaceae*
- miceti.

Tampone uretrale

72 campioni di tampone uretrale sono stati esaminati per la ricerca di:

- *Neisseria gonorrhoeae* (*Neisseria meningitidis*)
- *Haemophilus ducreyi*
- *Mobiluncus* spp. e altri anaerobi
- *Gardnella vaginalis*
- miceti.

Tampone vaginale

284 campioni di tampone vaginale sono stati esaminati per la ricerca di:

- *Enterobacteriaceae*
- *Staphylococcus aureus*
- *Streptococcus pyogenes*
- *Streptococcus agalactiae*
- *Gardnerella vaginalis*
- miceti.

Urine

Le urine venivano considerate significative solo se la carica batterica era uguale o superiore a 10^5 CFU/ml, ed una colonia corrisponde a 10^3 CFU/ml e sono stati esaminati 443 campioni per la ricerca di:

- *Enterobacteriaceae*
 - *Escherichia coli*
 - *Klebsiella* spp.
 - *Proteus* spp.
- *Enterococcus* spp.
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* e *S. saprophyticus*.
- miceti
- o qualsiasi altro germe presente in carica significativa.

Per pazienti particolari, come, ad esempio, quelli nefropatici, poteva essere considerata significativa anche una carica batterica di 30.000 e una coltura plurimicrobica.

Ricerca di *Mycobacterium tuberculosis* nell'espettorato

Sono stati esaminati 15 campioni di espettorato pervenuti nel Laboratorio di Micobatteriologia a San Zeno nell'aprile 2011.

Dopo colorazione di Ziehl-Neelsen (vedi paragrafo 3.1.27), i campioni sono stati osservati al microscopio ottico con un obiettivo da 100× ad immersione in olio, per la ricerca di *Mycobacterium tuberculosis*.

4.2 Esame parassitologico

Sono stati esaminati 20 campioni fecali pervenuti all'U.O. di Microbiologia Universitaria del Presidio Ospedaliero di Cisanello nel maggio 2011.

I campioni, processati mediante “tecnica di sedimentazione formolo/etil-acetato” sono stati osservati al microscopio ottico calibrato, per la ricerca di elminti e protozoi, utilizzando gli ingrandimenti 10× e 40×. Dei 20 campioni solo uno mostrava positività. In particolare, sono state evidenziate cisti di *Giardia intestinalis* (fig. 3.18).

Sono stati allestiti, per un paziente ambulatoriale, strisci ematici per la ricerca del plasmodio malarico. All'osservazione microscopica, dopo colorazione di May-Grunwald Giemsa, non si osservavano protozoi.

Inoltre, sono stati esaminati 35 campioni (20 fecali e 10 ematici) del programma V.E.Q (Valutazione Esterna Qualità) della Regione Toscana pervenuti all'U.O. di Microbiologia Universitaria del Presidio Ospedaliero di Cisanello negli anni 2010 e 2011. La tabella 4.1 mostra alcuni dei parassiti evidenziati.

Tabella 4.1: Valutazione Esterna Qualità 2010–2011.

Nº campio- ni osservati	Parassita osservato
2	<i>Entamoeba histolytica/dispar</i> (fig. 3.16)
3	<i>Giardia intestinalis</i> (fig. 3.18)
1	<i>Enterobius vermicularis</i> (fig. 3.21)
4	<i>Ascaris lumbricoides</i> (fig. 3.22)
2	<i>Taenia</i> spp. (fig. 3.23)
2	<i>Ancylostoma duodenale</i> (fig. 3.25)
1	<i>Strongyloides stercoralis</i> (fig. 3.26)
2	<i>Hymenolepis nana</i> (fig. 3.24)
3	<i>Schistosoma mansoni</i> (fig. 3.19)
3	<i>Plasmodium falciparum</i> (fig. 3.28 e 3.29)
2	<i>Trypanosoma brucei gambiense/rhodesiense</i> (fig. 3.30)
1	<i>Loa loa</i> (fig. 3.31)

Capitolo 5

CONCLUSIONI

Assistiamo, soprattutto, nei paesi ad elevata tecnologia, ad una diminuzione della morbilità e della mortalità per malattie infettive o contagiose ed ad un aumento delle malattie da infezione non trasmissibili; queste spesso vengono contratte in sede ospedaliera (infezione nosocomiale) o come conseguenza di trattamenti immunosoppressivi (infezioni opportunistiche). Il contrario, invece, continua ad osservarsi, nei paesi poveri e a scarsa o nulla tecnologia, come in Angola, dove drammaticamente le malattie infettive o contagiose, e non solo quelle sostenute da batteri, rappresentano ancora uno dei problemi sanitari predominanti.

Il presente lavoro di tesi, vuole riassumere l'apprendimento delle tecniche di base di microbiologia di un laboratorio generale, indicando aspetti operativi semplici e facilmente applicabili in un paese in via di sviluppo, con particolare riguardo alla Provincia angolana di Huambo, per dare risposte rapide e semplici ai quesiti diagnostici più frequenti nella situazione sanitaria locale.

Attualmente, la diagnosi microbiologica è indispensabile non solo per affrontare e cercare di risolvere i quesiti diagnostico-terapeutici nell'attività medica quotidiana, ma anche in occasione di epidemie ad eziologia microbiologica, soprattutto se importanti per la significatività dei tassi di morbilità e/o di mortalità.

L'impegno del candidato sarà quello di applicare nel suo paese le conoscenze acquisite con lo svolgimento di questa tesi allo scopo di dare un contributo significativo alla diminuzione dei problemi sanitari dell'Angola.

Bibliografia

- [1] Rio de Janeiro, Miguel dos Santos de Oliveira; *processo de descentralização do Serviço Nacional da Saúde de Angola* **2010**.
- [2] Governo de Angola, Ministério do Urbanismo e Ambiente. *Relatório do Estado Geral do Ambiente em Angola–MINUA*, **2006**.
- [3] Organização Mundial da Saúde, Escritório Regional Africano. *Estratégia da cooperação da OMS com os países, Angola 2009–2013*, **2009**.
- [4] Jornal de Angola, vice-governadore para a Área da Organização e Serviços Técnicos, José Alberto Kipungo, *formação na saúde reduz a mortalidade*, 12 de Janeiro de **2011**.
- [5] Ministério do Planeamento, Luanda, Angola, *Estratégia de combate à pobreza: Reinserção Social, Reabilitação e Reconstrução e Estabilização Económica*, 25 de Fevereiro de **2007**.
- [6] Faculdade de Medicina, Universidade do Porto (FMUP); Armindo José Queza, mestrado integrado em medicina *Sistema de Saúde em Angola: Proposta à Luz da Reforma do Serviço Nacional de Saúde em Portugal*. **2009/2010**.
- [7] Ministério da Saúde de Angola, Escritório Regional da Organizzazione Mondiale di Sanità para África (OMS/AFRO): *estratégia para a Medicina Tradicional na região africana, cerca de 80% de africano recorrem a Medicina Tradicional – Política Nacional de Saúde – 5º Esboço*, 20 de Março de **2009**.

- [8] *Estratégia da cooperação da OMS com os países, Angola. 2002–2005.*
- [9] Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT), Universidade de Nova Lisboa; Centro de Malária e Outras Doenças Tropicais (CMDT), Filomento Fortes/Nilton Saraiva; *situação da malária em Angola: primeiro seminário de terapêutica da malária da Comunidade dos Países de Língua Portuguesa (CPLP), de 9 a 11 de Outubro de 2006.*
- [10] United States Agency for International Development (USAID) HIV/AIDS hearth profile Angola, January **2011.**
- [11] AngolaPress, o médico do Programa Nacional de Luta Contra a Tuberculose e Lepra, Celestino Teixeira, *registados mais de mil casos de lepra em 2010, 20-04-2011.*
- [12] AngolaPress, o director geral do Instituto de Combate e Controlo das Trpanosomíases (ICCT), Josenando Teófilo, *país é o segundo em África mais afectado pela mosca tsé-tsé, 25-01-2008.*
- [13] Ministério da Saúde Fundação Oswaldo Cruz, centro de pesquisas rené rachou, Tazi Nimi Maria Maghema, *Signos, significados e acções associados à esquistossomose hematóbica no bairro Sassacária, Bengo-Angola/2004, Abril 2005.*
- [14] Agência para o Desenvolvimento Internacional dos Estados Unidos (USAID), *avaliação do sistema da saúde em Angola, 2010.*
- [15] AngolaPress, Direcção Provincial da Saúde no Huambo, o seu responsável Frederico Juliana, *funcionários da saúde terão subsídios de estímulo, 07 de Abril de 2011.*
- [16] AngolaPress, Supervisora Provincial do Programa da Saúde Sexual Reprodutiva no Huambo, Rosalina Catania, *sector de saúde no Huambo regista 14 mortes maternas 23-02-2011.*
- [17] Jornal de Angola, Director do Hospital Geral do Huambo Welema Cipriano da Fonseca, desapontado com médicos, 30 de Junho de **2010.**

- [18] AngolaPress, Director Clínico do Hospital Geral do Huambo, Fernando Felisberto Almeida, *taxa de mortalidade no hospital do Huambo calculada em 4,6 por cento 19 de Janeiro de 2011.*
- [19] AngolaPress, Director do Hospital Sanatorio do Huambo, Pedro Herculano, 05 de Janeiro de **2011.**
- [20] Heifts L. Gen-Probe test should not be considered final in *Mycobatrium tuberculosis* identification. *J Clin Microbiol* 37:229; **1989.**
- [21] Allen A.V H., Ridley D.S. Further observation on the formol-ether concentration tecnique for faecal parasites. *J. Clin. Pathol.* 23: 545–546 **1970.**
- [22] Gatti S., Swierczynsky G., Robison F., Anselmi M., Corrales J., Moreira J., Montalvo G., Bruno A., Maserati R., Bisoffi Z., Scaglia M. Amebic infection to the *Entamoeba histolytica-Entamoeba dispar* complex: a study of the incidence in a remote rural area of Ecuador. *Am J Trop Med Hyg.* 67 (1): 123–7 **2002** Jul.
- [23] Visser LG., Verei JJ., Van Esbroek M., Edeling VM., Clerinx J., and Polderman AM. Diagnostic methods for differentiation of *Entamoeba histolutica* and *Entamoeba dispar* in carriers: performance and clinical implication in a non-endemic setting. *Int J Med Microbiol*, 296(6): 397–403 **2006.**